

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Control de *Clostridium* spp. y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos, altas presiones y endolisinas fágicas

Control of *Clostridium* spp. and prevention of late blowing defect of cheese by antimicrobial-producing lactic acid bacteria, high pressure and phage endolysins

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Natalia Gómez Torres

Directoras

Sonia Garde López-Brea
Marta Ávila Arribas

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Control de *Clostridium* spp. y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos, altas presiones y endolisinas fágicas

Control of *Clostridium* spp. and prevention of late blowing defect of cheese by antimicrobial-producing lactic acid bacteria, high pressure and phage endolysins

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Natalia Gómez Torres

Directoras

**Sonia Garde López-Brea
Marta Ávila Arribas**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II

Control de *Clostridium* spp. y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos, altas presiones y endolisinas fágicas

Control of *Clostridium* spp. and prevention of late blowing defect of cheese by antimicrobial-producing lactic acid bacteria, high pressure and phage endolysins

Memoria presentada por **Natalia Gómez Torres** para optar al Título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directoras de la Tesis: Dra. Sonia Garde López-Brea y Dra. Marta Ávila Arribas
Departamento de Tecnología de Alimentos
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

EL DOCTORANDO

VºBº DE LAS DIRECTORAS



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



Sonia Garde López-Brea y Marta Ávila Arribas, Científicas Titulares del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA,

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “Control de *Clostridium* spp. y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos, altas presiones y endolisinas fágicas” de la que es autora Natalia Gómez Torres, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 11 de septiembre de 2017

Fdo. Sonia Garde López-Brea

Fdo. Marta Ávila Arribas

FINANCIACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral se realizó en el marco del proyecto RTA2011-00024-C01 “Bacterias lácticas productoras de agentes antimicrobianos y altas presiones en la prevención de la hinchazón tardía del queso” del Ministerio de Economía y Competitividad.

Durante la realización de la presente Tesis, su autora fue beneficiaria de una ayuda del subprograma de Formación de Personal Investigador FPI-INIA asociada al proyecto RTA2011-00024-C01, durante el periodo diciembre 2012-2016. Además, su autora disfrutó de dos ayudas para estancias científicas breves asociadas a la ayuda FPI-INIA, ambas en el laboratorio del Dr. Arjan Narbad en el Institute of Food Research (IFR, Norwich Research Park, Colney, Reino Unido) durante los periodos mayo-julio 2014 y septiembre-noviembre 2015.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Alteraciones microbiológicas del queso	3
2. <i>Clostridium</i> spp.	8
2.1. La espora bacteriana y el ciclo de vida de <i>Clostridium</i> spp.	9
2.2. Importancia de <i>Clostridium</i> spp. en productos lácteos	12
3. La hinchazón tardía del queso	14
3.1. Fuentes de contaminación de <i>Clostridium</i> spp. en leche y queso	17
3.2. Incidencia de <i>Clostridium</i> spp. en leche y queso	18
3.3. Detección de <i>Clostridium</i> spp. en queso	20
3.4. Estrategias de control para prevenir la hinchazón tardía del queso	22
3.4.1. Medidas preventivas en la granja	23
3.4.2. Eliminación de esporas mediante tratamientos físicos	23
3.4.3. Empleo de aditivos	24
3.4.4. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas	25
3.4.5. Otras estrategias de prevención	26
4. <i>Lactobacillus reuteri</i> , productor de reuterina	27
4.1. Reuterina	28
4.2. La reuterina en productos lácteos	30
5. Altas presiones, alimentos y microorganismos	31
5.1. Efecto sobre los componentes de los alimentos	32
5.2. Efecto sobre los microorganismos	33
5.3. Efecto sobre la espora bacteriana	35
5.4. Altas presiones, esporas y queso	37
6. Bacteriófagos y endolisinas fágicas	38
6.1. Endolisinas fágicas	40
6.2. Bacteriófagos y sus endolisinas como agentes de biocontrol en la industria alimentaria	41
6.3. Bacteriófagos y sus endolisinas como agentes de biocontrol de <i>Clostridium</i> spp. en la industria alimentaria	42
6.4. Endolisinas fágicas como sistemas de detección	43
OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL	45
CAPÍTULO 1. Implicación de distintas especies de <i>Clostridium</i> en la hinchazón tardía del queso	49
Prefacio del Capítulo 1	51
Publicación 1.1. Impact of <i>Clostridium</i> spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors	53

CAPÍTULO 2. Sensibilidad de <i>Clostridium</i> spp. a distintos compuestos antimicrobianos	63
Prefacio del Capítulo 2	65
Publicación 2.1. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related <i>Clostridium</i> species	67
CAPÍTULO 3. Control de <i>C. tyrobutyricum</i> y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos: nisina y reuterina	73
Prefacio del Capítulo 3	75
Publicación 3.1. Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a <i>Lactobacillus reuteri</i> adjunct	77
Publicación 3.2. Industrial-scale application of <i>Lactobacillus reuteri</i> coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting <i>Clostridium tyrobutyricum</i> in semi-hard ewe milk cheese	85
Publicación 3.3. Influence of reuterin-producing <i>Lactobacillus reuteri</i> coupled with glycerol on biochemical, physical and sensory properties of semi-hard ewe milk cheese	91
Publicación 3.4. Effect of reuterin-producing <i>Lactobacillus reuteri</i> coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese	101
Apéndice del Capítulo 3	109
CAPÍTULO 4. Control de <i>C. tyrobutyricum</i> y prevención de hinchazón tardía en queso mediante la aplicación de altas presiones	117
Prefacio del Capítulo 4	119
Publicación 4.1. Application of high pressure processing for controlling <i>Clostridium tyrobutyricum</i> and late blowing defect on semi-hard cheese	121
Publicación 4.2. Effect of high-pressure treatments on proteolysis, volatile compounds, texture, colour, and sensory characteristics of semi-hard raw ewe milk cheese	131
Apéndice del Capítulo 4	139
CAPÍTULO 5. Control y detección de <i>Clostridium</i> spp. mediante endolisinas fágicas	151
Prefacio del Capítulo 5	153
Publicación 5.1. Development of a specific fluorescent phage endolysin for <i>in situ</i> detection of <i>Clostridium</i> species associated with cheese spoilage	155
Publicación 5.2. Use of fluorescent CTP1L endolysin cell wall-binding domain to study the evolution of <i>Clostridium tyrobutyricum</i> during cheese ripening	185
Apéndice del Capítulo 5	203
DISCUSIÓN GENERAL	205
CONCLUSIONES	231
CONCLUSIONS	235
BIBLIOGRAFÍA	239

ÍNDICE DE TABLA Y FIGURAS

Tabla 1	Métodos empleados para la detección de <i>Clostridium</i> spp. en queso	22
Figura 1	Esquema de la estructura de la espora bacteriana	9
Figura 2	Ciclo de vida de las bacterias formadoras de esporas	12
Figura 3	Queso curado de oveja con hinchazón tardía	15
Figura 4	Fermentación del lactato por <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	16
Figura 5	Formación de 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) y 1,3-propanodiol (1,3-PDO) a partir de glicerol. El sistema reuterina y su mecanismo de acción	29
Figura 6	Equipos de altas presiones comercializados por la empresa española Hiperbaric	32
Figura 7	Ciclos biológicos de un bacteriófago	39
Figura 8	Estructura básica de una endolisina codificada por un bacteriófago que infecta a una bacteria gram-positiva	40
Figura 9	Micrografía electrónica de transmisión del bacteriófago virulento Φ CTP1 perteneciente a la familia <i>Siphoviridae</i> del orden <i>Caudovirales</i> y activo frente a <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	43

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis dos directoras de tesis Sonia y Marta por darme la oportunidad de descubrir este mundo tan maravilloso de la investigación. Nunca imaginé que ese 3 diciembre del 2012 en el que se iniciaban mis 4 años de Tesis doctoral fuera a descubrir una profesión tan gratificante, con continuos altibajos pero en la que se puede disfrutar y aprender mucho. Es fascinante poder contribuir de algún modo al mundo de la investigación. Gracias por haber confiado en mí, por haberme enseñado tanto y por vuestro apoyo dentro y fuera del laboratorio durante estos años. Pase lo que pase a partir de ahora, siempre quedará el equipo “Las Gladis” con el que hemos conseguido superar todas las piedras puestas en el camino.

Por supuesto, a mis tres pequeñas Rakel, Izaskun y África cuya amistad ha sido fundamental en estos años. Habéis demostrado ser grandes amigas para lo bueno y para lo malo, en lo profesional pero sobre todo en lo personal. Hemos vivido experiencias únicas e irrepetibles (princesa vinagre!, descenso del Sella diluviando, pillada en el bus de Turín, comidas, salidas, senderismo, risas, cumpleaños, cotilleos, sorpresas, y un largo etcétera). Es una de las mejores cosas que me puedo llevar de mi estancia en el INIA, a vosotras. Os adoro. También a vuestras parejas, Salva, Edu y Santos por ser tan grandes y por los buenos ratos pasados juntos. Y como no, a la pequeña Irati con la que pronto podremos disfrutar.

A mis queridos Javinchu y Anita, trabajadores sin duda y grandes personas. Gracias por todos los momentos compartidos en estos años y por la ayuda siempre que lo he necesitado. Sois geniales.

A todos mis compañeros del INIA, a lo que están y a los que ya se fueron. Isa, gran científica allá donde estés, gracias por tu alegría y tu ayuda con molecular. A Ana ‘la secre’ que sin ella hubiera sido mucho más difícil realizar todas las gestiones administrativas que tantos quebraderos de cabeza nos han ocasionado. Gracias por tu cariño y predisposición a ayudar siempre. Se te echa mucho de menos. A Tomi, compi de laboratorio (vuelve!), gracias por tu simpatía y tus consejos. A Susana y a Ángela, compis habituales de comida con buen rollo siempre en el lab. A Pilar Gaya, por todo el trabajo realizado con el HPLC, gracias por tu alegría y tus ánimos. A Juan, tan lleno de vitalidad siempre y con miles de proyectos. Gracias por tu buen humor y positivismo y como no, por el tiempo compartido en Norwich. A Marga, por su cariño y sus consejos. A Chiqui, por su predisposición. A Carmen Cuadrado, por su cariño y apoyo. A las nuevas generaciones incorporadas que tanta alegría han traído, Aida, Alejandro y Carlos. Mucho ánimo con todo, estáis empezando y con vuestras ganas y actitud llegareis alto. A Chema, por su ayuda con molecular y su simpatía. A Máximo, por esos momentos en el desayuno. Y al resto de compañeros del departamento por los buenos momentos vividos Manolo, Sagrario, Pilar López, Carmen Sánchez, Joaquín, Olga, Eva, Dani, Nerea, Blanca, Merche, Maite, Lucía, Claudia, etc.

A todo el súper equipo del Departamento de Gut Health & Food Safety del Institute of Food Research (IFR, Norwich, UK), hoy en día, Quadram Institute, con el que he coincidido durante mis dos estancias realizadas en el 2014 y 2015. Especialmente, quería agradecer a los doctores Arjan Narbad y Melinda J. Mayer por darme la oportunidad de vivir una experiencia tan gratificante y única. Melinda, gracias por introducirme en este mundo tan fascinante de la biología molecular, por enseñarme tanto, por tu paciencia, por tu vitalidad, por tus ánimos, por tu forma de trabajar y por tu confianza en mí siempre. Como no, a Rob Meijers y Matthew Dunne, por su ayuda con los experimentos y en la preparación del artículo. También quería agradecer a Enri, Fatma, Eliska, Nichola, Nwaneeka, Anna, Bhavika, Marieke, Christina, Thomas por vuestra gran ayuda en el laboratorio sobre todo al principio cuando andaba tan perdida, por enseñarme taaaanto, por la ayuda con el inglés en muchas ocasiones pero sobre todo por vuestro cariño, compañerismo, momentos de confesiones, los ratos de la comida, el café, las meriendas, los 'one-day trips', las quedadas, cenas y el buen ambiente en el laboratorio. Fuera del laboratorio quería agradecer a todos aquellos que hicieron que mi estancia en Inglaterra fuera aún más inolvidable: Clara, Sam, Benedetta, Lucca y Paloma (mis housemates, gracias por acogerme tan bien!), Cristina (gracias por presentarme a tanta gente al principio), Mónica, Anthony, Ian, Lee, Anabel, Ricardo, Dimitra, etc.

Quería agradecer también esta tesis a todo el equipo de la Estación Tecnológica de la Leche del ITACyL de Palencia, especialmente a David, Tomás, Luis, Carmen y Marta Hernández, por permitirnos realizar las fabricaciones de quesos allí y por la ayuda con los experimentos.

A todos mis amig@s que durante estos años se han interesado por mi trabajo y me han dado ánimos. Gracias por escucharme, por comprender mis ausencias en algunos momentos y mi estrés sobre todo al final. Cada uno de vosotros habéis sido piezas fundamentales en esta etapa y me habéis demostrado que sois grandes amig@s.

A mis chicas de CyTa Sara, Tamara, Rocío y Silvia por esas reuniones-brunch que me llenaban de tanta energía para continuar. Por esas conversaciones interminables de qué hacer con nuestras vidas, pensando siempre en como reinventarnos para conseguir un futuro mejor. Vuestro apoyo e ideas me han servido de mucho. A mi querido Abelillo que aunque en la lejanía también se ha interesado siempre y a Laura, por tu actitud científica (eres muy grande y llegarás lejos!) y por los consejos para la búsqueda de trabajo y ayudas con los curriculums.

A mis amig@s mostoleños, César y Noe (y pequeña Julia risueña) generosos y siempre mostrando un gran interés por lo que hacía en el laboratorio aunque muchas veces no entendieran lo que les contaba. Sois una pareja genial. También a Óscar que siempre que viene a España nos alegra con sus experiencias y buen rollo. Fonsy y Silvia, mis galleguiños preferidos, pareja 10! Alegres, generosos, positivos, cariñosos con los que comparto una gran amistad. Sergio y Ariadna (y pequeña Alma), mis chicos fitness, gracias por los buenos momentos.

También quería agradecer a Fabiola y Rodrigo (y bebé jefazo Álvaro), Santi y Vero, Aury y Jesus (y pequeña Alma), por las quedadas y buenos ratos juntos.

A la familia de Dani, Julio, Loli, Julito y Raquel porque ya somos todos una familia. Gracias por el apoyo en lo bueno y en lo malo, por vuestro cariño y generosidad, sois geniales y lo demostráis siempre. Y como no, gracias por darme uno de los mejores regalos del mundo, poder convertirme en tía de la pequeña Julia.

Finalmente, quería agradecer esta Tesis Doctoral a toda mi familia de Zaragoza (especialmente a mi tía Natalia), Castellón, Andorra y Extremadura (especialmente a mi tío Francis) pero principalmente a mis padres Antonio y Edu, y mis hermanas Patricia y Rocío. Habéis sido mi máximo apoyo en todo momento a lo largo de estos años. Gracias por vuestra confianza y vuestros ánimos pero, sobre todo, por creer en mí y en mis posibilidades. Por estar siempre ahí para escuchar mis alegrías y mis quejas haciéndome ver siempre el lado positivo de las cosas. Creo que no podría tener una familia mejor. Os quiero.

Aunque mucha gente me ha apoyado durante este tiempo, sin embargo, nunca habría dado este paso sin esa persona que me hace vivir cada día como si fuera único, porque me trata y me quiere como nadie y lo demuestra siempre, ese eres tú Dani. Porque a pesar de llevar juntos casi media vida, el respeto y el amor que sentimos no se apaga sino que aumenta cada día. Gracias por apoyarme siempre, en todas mis aventuras y proyectos. Porque eres mi motor para superarme cada día, por hacerme mejor persona y comprender cualquier cosa que me pase con solo mirarme. Porque has sido el novio perfecto, ahora el marido que nunca habría soñado y próximamente serás el padre más maravilloso del mundo. Aunque aún crece dentro de mí, quiero también dedicar esta Tesis a la mayor ilusión que podría haber tenido nunca, a ti Isaac. La felicidad que me transmites y el amor que me despiertas es insuperable e indescriptible. Ahora más que nunca tienes que ser fuerte y superar todo lo que venga. Juntos podremos con todo. Y, por supuesto, no olvidarme de ‘mi bichiti’, Nela, que tanta compañía me ha dado en este último año de tesis.

Finalmente, gracias a toda la gente que he conocido y que no he nombrado, especialmente a quién está a punto de leer los detalles de esta memoria, espero que mi trabajo contribuya de alguna manera al tuyo.

“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto”

Carl Sagan

Resumen

Control de *Clostridium* spp. y prevención de hinchazón tardía en queso mediante bacterias lácticas productoras de antimicrobianos, altas presiones y endolisinas fágicas

Introducción

La hinchazón tardía del queso, o fermentación butírica, es una de las principales causas de deterioro microbiano en los quesos semiduros y duros, y da lugar a defectos de textura, aroma y sabor, con un impacto económico desfavorable en la producción de queso. Se produce como consecuencia del crecimiento en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium* capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. La matriz del queso a menudo no puede resistir la presión del gas formado y aparecen ojos irregulares, grietas o rajaduras, a veces acompañadas de un sabor y olor rancio y desagradable. Aunque la hinchazón tardía es un problema antiguo, muy conocido por los fabricantes de queso, su erradicación es un problema difícil debido a la ubicuidad y la naturaleza resistente de las esporas de *Clostridium*, ya que un bajo número de esporas en la leche pueden causar el defecto si las condiciones en el queso son adecuadas para la germinación y crecimiento de *Clostridium*. La adición de nitrato o lisozima a la leche de fabricación es una práctica empleada habitualmente para el control de *Clostridium*. Sin embargo, estos aditivos presentan riesgos sanitarios, ya que el nitrato puede dar lugar a la formación de nitrosaminas cancerígenas, y la lisozima a la aparición de reacciones alérgicas. Además, el uso de estos aditivos aporta una solución parcial al problema de la hinchazón ya que, pese a su uso, los quesos se siguen hinchando.

Objetivos

En la presente Tesis Doctoral se planteó como objetivo principal la evaluación de distintas estrategias, alternativas a las existentes hoy en día, con el fin de prevenir la hinchazón tardía causada por *Clostridium* spp. en el queso. Las estrategias estudiadas han sido: el empleo de bacterias lácticas productoras de antimicrobianos (concretamente, de nisina o reuterina), la aplicación de altas presiones y el empleo de endolisinas fágicas. Además, se ha estudiado el efecto de las estrategias eficaces para prevenir la hinchazón tardía sobre las características microbiológicas, físico-químicas y sensoriales del queso. También se ha investigado la aplicación de endolisinas fágicas como sistema de detección de *Clostridium* spp. en queso.

Resultados

En el Capítulo 1 se ha llevado a cabo el estudio del grado de implicación de distintas especies de *Clostridium* (*Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii* y *Clostridium butyricum*) en la hinchazón tardía. Los primeros quesos en presentar esta alteración fueron los elaborados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y *C. tyrobutyricum* INIA 68, a los 7 días de maduración, seguidos por el queso elaborado con *C. beijerinckii* INIA 63, a los 50 días, por el elaborado con *C. sporogenes* INIA 71, a los 55 días, y por el elaborado con *C. butyricum* CECT 361, a los 60 días. Los quesos elaborados con las cepas de *C. tyrobutyricum* mostraron el mayor grado de hinchazón, caracterizado por una gran producción de gas en la bolsa de envasado, un intenso olor a ácido butírico y muchas rajaduras al corte. Estos quesos presentaron mayores valores de pH, y mayores niveles de ácidos butírico, propiónico y pentanoico, 1-propanol, 1-butanol y butanoato de etilo que el queso control elaborado sin *Clostridium*. Además, solo en estos quesos se detectó la presencia de propanal, butanal, 1-pentanol, propanoato de etilo, butanoato de metilo, butanoato de propilo, pentanoato de etilo y butanoato de butilo. Los quesos elaborados con *C. beijerinckii* INIA 63 y *C. sporogenes* INIA 71 mostraron un grado de hinchazón intermedio, y una fracción volátil caracterizada por mayores niveles de 2,3-butanodiona, 2-butanona y 2-butanol que el resto de quesos. En el queso elaborado con *C. butyricum* CECT 361 apenas se apreciaron síntomas de hinchazón, y mostró un perfil de compuestos volátiles similar al queso control a los 60 días de maduración.

En el Capítulo 2, y previo al estudio de la inhibición de *Clostridium* spp. por bacterias lácticas productoras de antimicrobianos en queso, se estudió la sensibilidad de las esporas y células vegetativas de 12 cepas pertenecientes a 4 especies de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes*) a nisina y reuterina en RCM y en leche, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La sensibilidad de *Clostridium* spp. a los antimicrobianos fue cepa dependiente pero, en general, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* mostraron mayores CMIs que el resto de especies. Las CMIs también fueron en general mayores para las esporas que para las células vegetativas y en leche que en RCM. La reuterina (CMIs: 0,51–32,5 mM) y la nisina (CMIs: 0,05–12,5 µg/ml) fueron capaces de inhibir el crecimiento de las células vegetativas y esporas de todas las cepas de *Clostridium*, tanto en RCM como en leche.

El Capítulo 3 describe el empleo de bacterias lácticas productoras de antimicrobianos para el control de *C. tyrobutyricum* y la prevención de hinchazón tardía mediante la producción *in situ* de nisina o reuterina en queso. A pesar de los resultados obtenidos en leche, el empleo de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* INIA 415, productor de nisina, como fermento en la elaboración de queso no controló el desarrollo de *C. tyrobutyricum* CECT 4011, y solo retrasó la aparición de hinchazón tardía una semana, pese a que la bacteriocina fue detectada en el queso durante toda la maduración. Por otra parte, se elaboraron quesos con *Lactobacillus reuteri* INIA P572, productor de reuterina. *Lb. reuteri* sobrevivió a la fabricación de queso y fue capaz de producir reuterina en presencia de glicerol (necesario para la síntesis de reuterina). Aunque la reuterina solo se detectó a las 6 y 24 h, la cantidad producida fue suficiente para controlar el crecimiento de *C. tyrobutyricum* y prevenir la hinchazón tardía causada por este microorganismo durante toda la maduración, tanto en queso de leche de vaca como de oveja, en presencia de distintos fermentos y diferentes concentraciones de glicerol, y en condiciones de fabricación a escala de laboratorio y a escala industrial. La adición de *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol tuvo un efecto significativo ($P < 0,01$) sobre algunas de las características del queso. El queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol mostró menores niveles de lactococos y lactobacilos, mayores valores de pH, mayor índice de proteolisis global, mayores valores de actividad aminopeptidásica y niveles de aminoácidos libres totales que el queso control. Además, la fracción volátil de este queso se caracterizó fundamentalmente por la aparición o incremento de la formación de compuestos relacionados con el metabolismo del glicerol (propanal, 2-propenal, 1-propanol, 2-propen-1-ol, 1,3-propanodiol, ácido propiónico, 1-etoxi-2-metilpropano e isopropil éter) y el catabolismo de aminoácidos (3-hidroxi-2-butanona, ácido acético, 2,3-pentanonodiona y 3-metilpiridina). La adición de *Lb. reuteri* con el glicerol dio lugar también a la disminución de la formación de algunos compuestos volátiles (etanol, acetato de etilo, butanoato de etilo, 2-heptanona y sulfuro de dimetilo) que podría relacionarse con los menores recuentos de bacterias lácticas registrados en este queso. Pese a las diferencias encontradas en los parámetros instrumentales entre el queso control y el elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,01$) para la calidad del olor y aroma ni para la intensidad del aroma. Sin embargo, la intensidad del olor fue menor en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol, circunstancia que podría explicarse por la menor formación de algunos compuestos volátiles (acetaldehído y ésteres de etilo) en este queso. Por otra parte, la mayor

proteolisis registrada en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol se reflejó en unas mayores puntuaciones para la calidad de sabor.

A continuación, en el Capítulo 4 investigamos la aplicación de altas presiones sobre quesos contaminados intencionadamente con esporas de *C. tyrobutyricum*. La germinación temprana e inesperada de las esporas durante el prensado de los quesos (antes de la aplicación de los tratamientos de alta presión a 200-500 MPa a los 7 días) impidió evaluar el efecto de esta estrategia sobre la germinación de las esporas. Sin embargo, esta circunstancia fue probablemente la que permitió prevenir la hinchazón tardía mediante la aplicación de un solo ciclo de alta presión igual o superior a 300 MPa, al inactivar las células vegetativas de *C. tyrobutyricum*, metabólicamente activas, procedentes de la germinación. El efecto de las altas presiones sobre las características del queso fue mayor a medida que se incrementó la presión aplicada. En líneas generales, los quesos presurizados mostraron menores niveles de bacterias, valores de actividad aminopeptidásica y niveles de compuestos volátiles, pero mayor concentración de aminoácidos libres que el queso control. Los quesos presurizados a 200-400 MPa obtuvieron unas puntuaciones similares al queso control para la intensidad y calidad del olor, aroma y sabor, calidad de la textura y calidad del color tras ser evaluados por un panel de catadores. En cambio, el queso presurizado a 500 MPa obtuvo una menor puntuación para la calidad del sabor aunque mayor para la calidad del aroma.

Por último, el Capítulo 5 se ha centrado en el empleo de la endolisina CTP1L, codificada por el bacteriófago virulento Φ CTP1 de *C. tyrobutyricum*, como antimicrobiano y como sistema de detección de *Clostridium* spp. en queso. No se observó actividad lítica de la endolisina CTP1L frente a ninguna de las 15 cepas de *Clostridium* spp. (*C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* y *C. butyricum*) ensayadas y aisladas de quesos con hinchazón tardía. Sin embargo, la endolisina CTP1L y su dominio de unión C-terminal (marcados con GFP) se unieron a 10 y 11 de estas 15 cepas, respectivamente. Además, ambas moléculas fueron capaces de unirse a las esporas de *C. beijerinckii* INIA 77, pero no se unieron a ninguna de las bacterias lácticas ensayadas. Por otra parte, la aplicación de la técnica en queso permitió visualizar *in situ* por primera vez y de manera específica las células vegetativas de *Clostridium* en la matriz de un queso hinchado.

Conclusiones

C. tyrobutyricum resultó ser un potente agente causal de la hinchazón tardía, aunque otras especies de *Clostridium* también fueron capaces de producir hinchazón en el queso.

La nisina y la reuterina presentaron un amplio espectro anti-clostridium en RCM y en leche, inhibiendo el crecimiento de las células vegetativas y esporas de todas las cepas de *Clostridium* testadas. Sin embargo, la nisina producida *in situ* por *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 no previno la hinchazón tardía del queso causada por *C. tyrobutyricum*.

Por otra parte, la reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* INIA P572 a partir de glicerol inhibió el crecimiento de *C. tyrobutyricum* y previno la aparición de hinchazón del queso, sin perjudicar su calidad sensorial cuando el glicerol se añadió a la leche en concentraciones inferiores a 100 mM.

El estudio del efecto de las altas presiones sobre la germinación de las esporas de *C. tyrobutyricum* fue limitado, ya que este microorganismo germinó antes de la presurización. Probablemente debido a ello, la aplicación de un solo ciclo de alta presión a 300 MPa fue suficiente para inactivar las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* y evitar la hinchazón tardía del queso sin afectar a su calidad sensorial.

La endolisina CTP1L presentó un espectro de actividad lítica muy limitado, siendo incapaz de lisar las cepas de *Clostridium* aisladas de quesos con hinchazón. Sin embargo, su espectro de unión fue amplio, con especificidad a nivel de género y, además, la endolisina fue capaz de unirse a esporas de *Clostridium*. La aplicación del dominio de unión de la endolisina CTP1L marcado con GFP permitió la visualización de las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* en el queso. El estudio reveló que las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* se lisan durante la maduración, y confirmó la baja tasa de esporulación de este microorganismo. Este comportamiento de *C. tyrobutyricum* durante la maduración del queso explicaría la dificultad que existe para su aislamiento.

Summary

Control of *Clostridium* spp. and prevention of late blowing defect of cheese by antimicrobial-producing lactic acid bacteria, high pressure and phage endolysins

Introduction

Late blowing defect (LBD) is one of the major causes of microbial spoilage in semi-hard and hard cheeses, resulting in texture and flavour defects, with an unfavourable economic impact on cheese production. The undesirable butyric acid fermentation responsible for LBD is caused by the outgrowth in cheese of some species of the genus *Clostridium* capable of fermenting lactic acid with production of butyric acid, acetic acid, carbon dioxide and hydrogen, causing the cheeses to blow. The cheese matrix often cannot withstand the pressure of the evolved gas and irregular eyes, cracks or splits appear, sometimes accompanied by rancid flavour and unpleasant smell. Although LBD of cheese is an old problem, very well known by cheese manufacturers, eradicating it is a difficult issue due to the ubiquitous presence and resistant nature of *Clostridium* spores, even low spore counts in milk can cause LBD if cheese conditions are suitable for the germination and growth of *Clostridium*. The additions of nitrate and/or lysozyme to the cheese milk are common strategies to prevent LBD of cheese. However, these preservatives present some health concerns since nitrate can lead to the production of nitrosamines, many of which are carcinogenic, and lysozyme may pose risks for allergic subjects. Moreover, the use of these additives provides only a partial solution to the LBD problem since, despite their use, cheeses continue to blow.

Objectives

The main objective of this Doctoral Thesis was evaluating alternative strategies different to the use of those additives, in order to prevent the LBD caused by *Clostridium* spp. in cheese. The strategies, individually studied, were: the use of lactic acid bacteria producing antimicrobials (specifically, nisin or reuterin); the application of high pressure treatments; and the use of phage endolysins. In addition, the effect of those strategies that were effective in preventing LBD on the microbiological, physico-chemical and sensory characteristics of cheese has been studied. The application of phage endolysins as a detection system for *Clostridium* spp. in cheese was also investigated.

Results

In Chapter 1, before evaluating the different strategies, the degree of involvement of different species of *Clostridium* (*Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium butyricum*) in LBD has been studied. The first cheeses to present symptoms of spoilage were those made with *C. tyrobutyricum* CECT 4011 and *C. tyrobutyricum* INIA 68, at 7 days of ripening, followed by the cheese made with *C. beijerinckii* INIA 63, at 50 days, by the cheese made with *C. sporogenes* INIA 71, at 55 days, and finally with that inoculated with *C. butyricum* CECT 361, at 60 days. Those cheeses manufactured with the *C. tyrobutyricum* strains showed the highest degree of blowing, which was characterized by extensive gas production in the packaging, an intense butyric acid odour and many irregular cracks or splits in the cheese matrix. These cheeses had higher pH values, higher levels of butyric, propionic and pentanoic acids, and 1-propanol, 1-butanol and ethyl butanoate than the control cheese made without *Clostridium*. In addition, propanal, butanal, 1-pentanol, ethyl propanoate, methyl butanoate, propyl butanoate, ethyl pentanoate and butyl butanoate were only detected in LBD cheeses made with *C. tyrobutyricum* strains. Cheeses contaminated with *C. beijerinckii* INIA 63 and *C. sporogenes* INIA 71 showed milder LBD symptoms, and a volatile profile characterized by higher levels of 2-butanone, 2,3-butanedione and 2-butanol than the rest of cheeses. Cheese inoculated with *C. butyricum* CECT 361 presented a slightly blown pack at the end of ripening, and showed a volatile profile similar to control cheese after 60 days of ripening.

In Chapter 2, prior to studying the inhibition of *Clostridium* spp. in cheese by antimicrobial-producing lactic acid bacteria, we evaluated the susceptibility of spores and vegetative cells of 12 strains belonging to 4 species of *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* and *C. sporogenes*) to nisin and reuterin, in RCM and in milk, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The sensitivity of *Clostridium* spp. to the antimicrobials was strain-dependent. In general, *C. sporogenes* and *C. beijerinckii* showed higher MICs than the other species. The MICs were also generally higher for spores than for vegetative cells, and in milk than in RCM. Reuterin (MICs: 0.51-32.5 mM) and nisin (MICs: 0.05-12.5 µg/ml) were able to inhibit the growth of vegetative cells and spores of all tested *Clostridium* strains, both in RCM and in milk.

Chapter 3 describes the use of lactic acid bacteria producing antimicrobials in order to prevent the LBD caused by *Clostridium* spp. by *in situ* production of nisin or reuterin in cheese. Despite the results obtained in milk, the use of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415, a nisin producer, as cheese starter, did not control the development of *C. tyrobutyricum* CECT 4011, and only delayed the appearance of LBD by one week, whilst the bacteriocin was detected in cheese throughout the ripening period. Reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* INIA P572 was added to cheese as an adjunct culture together with glycerol (required for reuterin production), with the aim of controlling *C. tyrobutyricum* growth and preventing LBD of cheese. *Lb. reuteri* survived cheese manufacture and produced reuterin *in situ*, detected at 6 and 24 h. The produced reuterin was enough to inhibit the growth of *Clostridium*, and, therefore, to prevent cheese LBD during ripening in ewe's milk cheese as well as in cow's milk cheese, in the presence of different cheese starters and glycerol concentration, and under laboratory-scale and industrial-scale cheese manufacturing conditions. The addition of *Lb. reuteri* INIA P572 and glycerol had a significant effect ($P < 0.01$) on some of the cheese characteristics. The cheese made with *Lb. reuteri* and glycerol showed lower levels of lactococci and lactobacilli, higher pH values, higher overall proteolysis index, higher values of aminopeptidase activity and total free amino acid levels than control cheese. Furthermore, the volatile profile of this cheese was mainly characterized by the appearance or increase of the formation of compounds related to the metabolism of glycerol (propanal, 2-propenal, 1-propanol, 2-propen-1-ol, 1,3-propanediol, propionic acid, 1-ethoxy-2-methylpropane and isopropyl ether) and amino acid catabolism (3-hydroxy-2-butanone, acetic acid, 2,3-pentanedione and 3-methylpyridine). Besides, the addition of *Lb. reuteri* with glycerol resulted in a decrease in the formation of some volatile compounds (ethanol, ethyl acetate, ethyl butanoate, 2-heptanone and dimethyl sulfide) that could be related to the lower counts of lactic acid bacteria of this cheese. Despite the changes detected by instrumental analysis between control cheese and that made with *Lb. reuteri* and glycerol, no significant differences ($P > 0.01$) were found for overall odour and aroma quality of cheese although it resulted in a significant decrease of the odour intensity scores. This fact may be explained by a lower formation of some volatile compounds (acetaldehyde and ethyl esters) in this cheese. On the other hand, the greater degree of proteolysis observed in the cheese made with *Lb. reuteri* and glycerol led to higher scores for taste quality.

Next, in Chapter 4, we investigated the application of high pressures on cheeses deliberately contaminated with spores of *C. tyrobutyricum*. An early and unexpected germination of the added spores during cheese pressing (prior to the application of high pressure treatments at 200-500 MPa on day 7) hindered the evaluation of the effect of high pressure on spore germination. However, this circumstance probably allowed for preventing LBD by applying a single high pressure cycle of 300 MPa or higher, by inactivating the metabolically active *C. tyrobutyricum* vegetative cells originated after germination. The effect of the high pressure on the cheese characteristics was greater as the applied pressure was increased. In general, pressurized cheeses showed lower bacteria numbers, aminopeptidase activity values and levels of volatile compounds, but a higher concentration of free amino acids than control cheese. Cheeses pressurized at 200-400 MPa were scored similarly to control cheese for intensity and quality of odour, aroma and taste, and for texture and colour quality after being evaluated by panellists. In contrast, cheese pressurized at 500 MPa obtained a lower score for taste quality, although a higher one for aroma quality.

Finally, Chapter 5 focuses on the application of CTP1L endolysin, encoded by the virulent bacteriophage Φ CTP1 of *C. tyrobutyricum*, to prevent LBD and as a detection system for *Clostridium* spp. in cheese. No lytic activity of CTP1L endolysin was observed against any of the 15 strains tested of *Clostridium* spp. (*C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* and *C. butyricum*), isolated from LBD cheeses. However, CTP1L endolysin and its C-terminal binding domain (GFP-labelled) bound to 10 and 11 of these 15 strains, respectively. In addition, both GFP-labelled molecules were able to bind to spores of *C. beijerinckii* INIA 77, but did not bind to any of lactic acid bacteria tested. On the other hand, when the technique was applied in cheese it allowed visualizing *in situ*, for the first time, and specifically, the vegetative cells of *Clostridium* in the matrix of a blown cheese.

Conclusions

C. tyrobutyricum proved to be a potent cheese spoiler causing LBD, although other *Clostridium* species were also able to produce this defect in cheese.

Nisin and reuterin, presented a broad anti-clostridia spectrum in RCM and in milk, as they inhibited the growth of vegetative cells and spores of all strains tested. However, the nisin

produced *in situ* by *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 was not enough to prevent cheese LBD caused by *C. tyrobutyricum*.

The reuterin produced *in situ* by *Lb. reuteri* INIA P572 was able to inhibit *C. tyrobutyricum* growth and to prevent the appearance of LBD in cheese, without impairing its sensory quality, when glycerol was added to milk at concentrations below 100 mM.

The study of the effect of high pressures on the germination of *C. tyrobutyricum* spores was limited, since this microorganism germinated prior to pressurization. Probably because of this, the application of a single high pressure cycle at 300 MPa was enough to inactivate vegetative cells of *C. tyrobutyricum* and to prevent LBD of cheese without affecting its sensorial quality.

The endolysin CTP1L encoded by bacteriophage Φ CTP1 showed a narrow spectrum of lytic activity, being unable to lyse any of the *Clostridium* strains isolated from cheeses with LBD. Notwithstanding, it showed a broad binding spectrum, with a genus-level of specificity, and, in addition, the endolysin was able to bind *Clostridium* spores. The application of the C-terminal binding domain of the endolysin CTP1L, GFP-labelled, allowed the visualization of the *C. tyrobutyricum* vegetative cells in cheese and to study their evolution and physiological state by means of phase contrast and fluorescence microscopy. It revealed that the vegetative cells of *C. tyrobutyricum* lyse during ripening, and further confirmed the low sporulation rate of this microorganism. This behaviour of *C. tyrobutyricum* during cheese ripening would explain the difficulties that exist for its isolation.

Introducción General

1. Alteraciones microbiológicas del queso

El queso es un alimento muy antiguo que apareció originariamente como una manera de conservar la leche, un producto altamente perecedero. Hoy en día se estima que existen más de 2000 variedades de queso en todo el mundo, con características únicas con respecto al sabor y la textura (Gunasekaran y Ak 2003). El queso es uno de los productos lácteos más comercializados a nivel mundial, con una producción europea de más de 10,5 millones de toneladas en 2015 (www.eurostat.eu). El consumo de este producto se ha convertido en un fenómeno global importante, y los consumidores exigen productos de mayor calidad sensorial y valor nutricional, y con ausencia de compuestos tóxicos o que supongan un riesgo para la salud (Zuljan y col. 2016).

En la Norma General para el Queso (CODEX STAN 283-1978) del *Codex Alimentarius* para Leche y Productos Lácteos establecido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se describe el queso de la siguiente manera:

“2.1 Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas del suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

a. Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada, leche parcialmente desnatada, nata, nata de suero, o suero de mantequilla, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso da lugar a una concentración de la proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o

b. Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a.

2.1.1 Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una

temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión.

2.1.2 Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.

2.1.3 Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.”

Las características sensoriales de los quesos sometidos a maduración se desarrollan durante la misma gracias a la acción de enzimas procedentes de la leche, del cuajo, y de las bacterias del cultivo iniciador y de la microbiota secundaria. La actuación conjunta de estas enzimas da lugar a una degradación de las proteínas, la grasa y la lactosa presentes en la cuajada fresca, con formación de compuestos precursores o directamente responsables de las características sensoriales del queso. La proteólisis, la lipólisis y el metabolismo de la lactosa y del citrato son los principales fenómenos bioquímicos que se producen durante la elaboración y maduración del queso.

Aunque algunos quesos se elaboran sin añadir cultivos iniciadores, también llamados fermentos lácticos o “starters”, en general las poblaciones de microorganismos que encontramos en el queso se pueden diferenciar, principalmente, en dos grupos: cultivos iniciadores y microbiota secundaria no iniciadora. Los cultivos iniciadores son cultivos puros o mezclas de bacterias lácticas con características apropiadas para llevar a cabo la fermentación de la leche en la elaboración de los diversos productos lácteos fermentados. En la elaboración de queso se utilizan varios tipos, principalmente para acidificar la leche hasta el pH adecuado mediante la producción de ácido láctico, pero además tienen un papel clave en el desarrollo de las características sensoriales durante la maduración, como ya se ha mencionado. Los fermentos empleados en la elaboración de quesos están formados por cepas de bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. La microbiota secundaria no iniciadora está constituida fundamentalmente por bacterias lácticas y propiónicas, levaduras, mohos y hongos filamentosos (Fox y col. 2000). La microbiota secundaria también influye en el desarrollo del sabor, aroma, color y textura de los quesos durante su maduración, sin contribuir, o contribuyendo mínimamente, a la acidificación de la

leche debido a su metabolismo aeróbico o a su incapacidad para utilizar la lactosa (Ratnay y Eppert 2011). Estos microorganismos pueden añadirse intencionadamente durante la elaboración del queso, siendo los más habituales los mohos como *Penicillium camemberti* y *Penicillium roqueforti*, y las propionibacterias, o constituir una población autóctona del queso al proceder de la leche de fabricación o del ambiente de quesería, o al contaminar el queso de forma accidental durante el proceso de fabricación. En general, las bacterias lácticas pertenecientes a los cultivos iniciadores son las predominantes durante las fases de elaboración del queso y en la primera etapa de la maduración. Sin embargo, su número desciende a medida que avanza el proceso de maduración siendo remplazados por la microbiota secundaria.

El queso, como otros alimentos, es susceptible de sufrir defectos y alteraciones del producto final, lo que supone importantes pérdidas económicas para las industrias queseras. La aparición de estos defectos y alteraciones depende del control de los distintos factores microbiológicos y tecnológicos que condicionan el proceso de elaboración y maduración del queso. Entre ellos se encuentran la calidad (microbiológica, composición) y pre-tratamiento de la leche de partida, las prácticas higiénicas, las diferentes actividades de los cultivos iniciadores y su capacidad acidificante, la tecnología de fabricación y las condiciones de maduración del queso, así como la naturaleza y número de microorganismos de la microbiota secundaria (O'Sullivan y col. 2013). De todos estos factores, los microbiológicos son los más difíciles de controlar. Identificar los principales defectos y alteraciones de los quesos y conocer los factores microbiológicos y tecnológicos implicados en cada caso puede ayudar a evitar su aparición, mejorar la calidad de los quesos y la rentabilidad de las empresas queseras.

La producción de compuestos volátiles responsables del aroma y sabor por parte de la microbiota del queso se considera fundamental a la hora de evaluar la calidad de un queso. Sin embargo, cuando se superan ciertos límites en la concentración de estos compuestos, o cuando se produce un desequilibrio entre los mismos, aparecen defectos olfato-gustativos (McSweeney 2007) como amargor, rancidez hidrolítica y olores de naturaleza azufrada o sulfurada (Lemieux y Simard 1991). Los defectos de amargor, causados por la acumulación de péptidos hidrófobos de bajo peso molecular, pueden ser resultado tanto de una proteólisis excesiva de caseínas como de una baja actividad peptidásica de los fermentos (Sousa y col. 2001). Las proteinasas producidas por microorganismos psicrótrofos como *Pseudomonas* resisten la pasteurización, dando lugar a la acumulación de péptidos amargos (Lemieux y Simard 1991).

Por otro lado, la rancidez hidrolítica es debida a la hidrólisis de los triglicéridos de la leche, que libera ácidos grasos de cadena corta que confieren olores desagradables (rancio) al queso. La enzima habitualmente implicada es una lipasa o esterasa. Las bacterias lácticas del fermento y de la microbiota secundaria, los mohos, así como la microbiota de los quesos madurados en superficie (quesos de corteza lavada, “smear-ripened cheeses”), producen lipasas y, por tanto, podrían, potencialmente, ocasionar rancidez hidrolítica (O’Sullivan y col. 2013). Sin embargo, la capacidad lipolítica de la mayoría de las bacterias lácticas es baja, por lo que lo que influye en la producción de niveles notables de ácidos grasos libres es el número de bacterias así como el tiempo que están en contacto con la grasa del queso (Collins y col. 2003). Las bacterias propiónicas son considerablemente más lipolíticas que las bacterias lácticas, y los mohos como *Penicillium* spp. son potentes agentes lipolíticos.

Los compuestos volátiles azufrados como dimetil di- y tri-sulfuro contribuyen al sabor y aroma característicos de muchos quesos madurados en superficie y quesos blandos como el Brie, Camembert y Limburger. Las bacterias corineformes son las mayores productoras de estos compuestos, que dan lugar a olores de naturaleza sulfurada, aliáceos, a col y a queso muy maduro (O’Sullivan y col. 2013). Sin embargo, el umbral de percepción de los compuestos volátiles azufrados es bajo, por lo que si se excede su límite, el sabor y aroma de los quesos pueden verse afectados negativamente (Sable y Contenceau 1999).

Otros defectos de sabor y aroma en queso causados por microorganismos incluyen la formación de aromas afrutados o a yogur. Los aromas afrutados se producen como consecuencia de la producción excesiva de ésteres de etilo por algunas cepas de *Lactococcus lactis*. Además, la producción de alcoholes y aldehídos ramificados por ciertas cepas de *L. lactis* también se ha asociado con olores desagradables descritos como olores afrutados y olor a avellana tostada (Morales y col. 2003). Por otro lado, el desarrollo de aroma a yogur en queso se ha asociado con una producción excesiva de acetaldehído por algunas cepas de *L. lactis* subesp. *cremoris*.

La aparición de cristales de lactato cálcico o de coloraciones anómalas son otros defectos de origen microbiológico que también pueden encontrarse en el queso. Los cristales de lactato cálcico aparecen como pequeños depósitos blanquecinos en la superficie y, aunque son inocuos, pueden provocar el rechazo del producto (O’Sullivan y col. 2013). Estos cristales se forman debido a la racemización del L-lactato a su isómero menos soluble D-lactato, mediante la

enzima L-lactato deshidrogenasa de algunas bacterias lácticas de la microbiota secundaria como *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Por otro lado, la aparición de coloraciones anómalas tanto en la superficie como en la masa del queso, como la decoloración rosácea, puede deberse al crecimiento de ciertas cepas de *Lactobacillus delbrueckii* que no pueden reducir el potencial redox del queso o al de propionibacterias productoras de pigmentos.

Sin embargo, entre las alteraciones microbiológicas que más problemas provocan se encuentran las denominadas hinchazones del queso (O'Sullivan y col. 2013), causadas por distintos microorganismos capaces de degradar la lactosa o el ácido láctico y producir gas (hidrógeno y dióxido de carbono) y/o ácidos volátiles (fundamentalmente ácidos butírico y propiónico). El exceso de gas producido da lugar a la aparición en la masa del queso de ojos, cavidades o rajás que no son propias del mismo en cuanto a número, tamaño o forma, pudiendo deformar la superficie del queso. Además, la presencia de estos gases y compuestos volátiles también da lugar al desarrollo de sabores y olores desagradables. La formación de gas puede ocurrir al poco tiempo de iniciarse la fabricación del queso (hinchazón temprana) o ya avanzado el proceso de maduración (hinchazón tardía), siendo distintos los microorganismos responsables de la formación de gas en uno u otro caso. La hinchazón temprana se ha asociado con la presencia en el queso de bacterias coliformes como *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y/o *Serratia*, debido a unas malas prácticas higiénicas o al empleo de leche sin pasteurizar. Estos microorganismos producen dióxido de carbono y/o hidrógeno como subproductos del metabolismo de la lactosa. Otros microorganismos también implicados en la producción temprana de gas en queso son levaduras como *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* y *Candida*. Algunas bacterias lácticas, como *Streptococcus thermophilus* y *L. lactis* subesp. *lactis* biovar diacetylactis, también pueden producir gas a partir de lactosa residual, galactosa, aminoácidos, urea y/o citrato presentes en el queso (Mullan 2000; Ledenbach y Marschall 2010). Las bacterias lácticas heterofermentativas como *Leuconostoc* o algunos lactobacilos también pueden producir hinchazón del queso por la producción de dióxido de carbono a partir de lactosa residual. El crecimiento anormal de bacterias propiónicas, que fermentan lactosa y/o lactato a ácido propiónico y dióxido de carbono, también puede dar lugar a la hinchazón del queso. La hinchazón tardía del queso, o fermentación butírica, se produce como consecuencia del crecimiento en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium* spp. capaces

de fermentar el ácido láctico con producción de ácidos butírico y acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Garde y col. 2013).

La hinchazón tardía del queso causada por *Clostridium* es un problema antiguo muy conocido por los fabricantes de queso. Sin embargo, hoy día persiste como una de las principales causas de alteración microbiológica de los quesos curados y semicurados, a pesar de las medidas preventivas adoptadas en las granjas lecheras y queserías, como se detallará en esta Tesis Doctoral, por lo que el desarrollo de nuevas estrategias orientadas a prevenir la aparición de esta alteración resultaría de gran interés.

2. *Clostridium* spp.

El género *Clostridium*, perteneciente a la familia *Clostridiaceae*, está formado por 220 especies (LPSN www.bacterio.net) en el momento de escribir la presente Tesis Doctoral. *Clostridium* spp. son bacilos gram-positivos, formadores de endosporas, que suelen aparecer solos, en pareja o formando cadenas cortas. Pueden ser móviles, por flagelos peritricos, o inmóviles. Sus esporas presentan una forma ovalada o esférica y se sitúan en el centro del bacilo o en un extremo subterminal deformando, generalmente, la célula vegetativa. En general, las especies que forman este género son anaerobios estrictos, y la mayoría de las células vegetativas mueren en presencia de oxígeno, pero todas las esporas sobreviven a largas exposiciones a oxígeno/aire. Sin embargo, algunas especies como *Clostridium perfringens* son anaerobios facultativos y pueden soportar la presencia de oxígeno (Charlebois y col. 2014). Como anaerobios, tienen un metabolismo de tipo estrictamente fermentativo, con una capacidad excepcionalmente amplia para fermentar compuestos orgánicos, incluyendo muchos carbohidratos simples y complejos, pero también proteínas, aminoácidos y otras moléculas orgánicas (Tracy y col. 2012).

El género *Clostridium* contiene especies que pueden crecer en un amplio rango de temperaturas y pHs. La mayoría de especies presentan un pH óptimo de crecimiento entre 6-7, pero algunas son capaces de crecer a pH por debajo de 4 o por encima de 8 (Johnson 2009). Habitualmente *Clostridium* spp. crece a 25-37 °C, pero existen también especies psicrófilas y termófilas en el género. Además de estar ampliamente distribuidas en el medio ambiente, algunas especies de *Clostridium* forman parte de la microbiota intestinal de humanos y

animales. Aunque la mayor parte de las numerosas especies de *Clostridium* no son patógenas, el género incluye también patógenos productores de exotoxinas como *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* y *C. perfringens*. Las esporas de muchas especies de este género son contaminantes comunes de los alimentos, donde son capaces de crecer causando su deterioro y/o intoxicaciones alimentarias.

2.1. La espora bacteriana y el ciclo de vida de *Clostridium* spp.

Las endosporas bacterianas son estructuras celulares durmientes, es decir metabólicamente inactivas, en el ciclo de vida de la bacteria formadora. Las esporas bacterianas probablemente sean las formas de vida más resistentes del planeta, y pueden sobrevivir en su estado latente durante muchos años (Gould 2006). La resistencia y longevidad de las esporas están relacionadas con su estructura y composición, muy diferente a la de las células vegetativas, ya que incluye varias envueltas y muchos constituyentes que son únicos de las esporas (Figura 1). Desde la parte más externa a la más interna, la estructura de la espora bacteriana consta del exosporium, la cubierta, la membrana externa, la corteza, la pared, la membrana interna y, finalmente, el núcleo (Leggett y col. 2012).

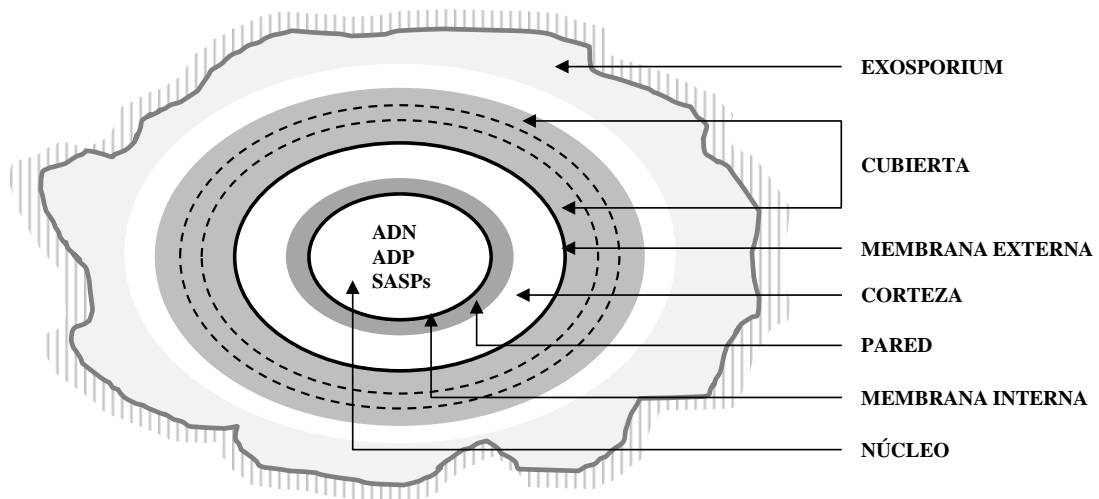


Figura 1. Esquema de la estructura de la espora bacteriana. ADP (ácido dipicolínico) y SASPs (del inglés "small acid-soluble proteins"). Fuente: Adaptado de Garde y col. (2017).

Las funciones que se le atribuyen al exosporium están relacionadas con el proceso de germinación, crecimiento y adhesión (Brunt y col. 2015; Stewart 2015). El exosporium es de

naturaleza glicoproteica y contribuye a la hidrofobicidad general de la espora y, por tanto, a su capacidad de adhesión, muy importante en la formación de biofilms en superficies de procesamiento de alimentos. La cubierta de la espora consta de una serie de finas capas concéntricas, cuyo número varía en función de la especie, y está formada principalmente por proteínas (McKenney y col. 2013). La principal función conocida de la cubierta es la protección de la espora frente al estrés ambiental (McKenney y col. 2013), actuando como una barrera impermeable a enzimas degradadoras como la lisozima y a moléculas tóxicas. Además, se ha sugerido que algunas enzimas asociadas con la cubierta de la espora podrían servir para detoxificar sustancias químicas potencialmente dañinas. En algunas especies, la cubierta puede contener pigmentos capaces de absorber fuertemente en la región ultravioleta, lo que podría estar relacionado con su resistencia a la luz ultravioleta (McKenney y col. 2013). Otra función de la cubierta es la regulación de la germinación, actuando como un tamiz molecular que excluye moléculas grandes permitiendo al mismo tiempo el paso de pequeñas moléculas germinantes, reteniendo las enzimas necesarias para la degradación del peptidoglicano de la corteza y/o modificando o degradando los germinantes mediante enzimas presentes en la cubierta (Moir y Cooper 2015).

La membrana externa, bajo la cubierta, es esencial para la formación de la espora, aunque su importancia en la espora madura aún no está clara (Leggett y col. 2012). La corteza está compuesta de un peptidoglicano específico de la espora que se caracteriza por la ausencia de ácidos teicoicos unidos al ácido N-acetilmurámico, por la presencia de restos de lactama del ácido murámico y por un bajo grado de entrecruzamiento entre péptidos (Leggett y col. 2012). Estas modificaciones específicas de la corteza resultan cruciales para lograr la latencia de la espora y/o sus propiedades de resistencia. Debajo de la corteza existe una segunda capa de peptidoglicano con una estructura similar a la de las células vegetativas, la pared de la espora, que se convierte en la pared celular cuando se produce la germinación y el crecimiento de la espora. La membrana interna presenta una composición de ácidos grasos y fosfolípidos poco habitual, y es relativamente impermeable a las moléculas pequeñas (Leggett y col. 2012), lo que parece ser importante en la resistencia de las esporas frente a algunos compuestos químicos biocidas al restringir el acceso a sus moléculas diana en el núcleo de la espora (Setlow 2014b).

El núcleo se localiza en el centro de la espora y contiene ADN, ARN, ribosomas y la mayoría de enzimas y pequeñas moléculas (Setlow 2014a). Presenta una serie de características que desempeñan funciones variadas en la resistencia de la espora: (1) bajo contenido en agua

(25 a 55% del peso húmedo), factor importante tanto en la latencia enzimática de la espora como en su resistencia al calor y a algunos químicos; (2) altos niveles de ácido dipicolínico en un complejo 1:1 con varios cationes divalentes, generalmente Ca^{2+} , importante en la resistencia frente a algunos agentes que producen daños en el ADN y en el mantenimiento de la latencia de la espora; y (3) altos niveles de unas pequeñas proteínas especiales (llamadas SASPs, del inglés "small acid-soluble proteins") que forman complejos con el ADN de la espora protegiéndolo del daño por sustancias químicas genotóxicas, desecación, calor seco y húmedo, y radiaciones γ y UV. Cuando se produce la germinación, estas proteínas se hidrolizan rápidamente, y los aminoácidos resultantes se emplean en la síntesis de nuevas proteínas necesarias en la germinación y crecimiento ulterior.

La esporulación es una estrategia de las bacterias formadoras de esporas para sobrevivir a las condiciones ambientales adversas mediante la que las bacterias cesan el crecimiento vegetativo y forman una espora en el interior del citoplasma de la célula madre (Figura 2). Estas esporas son metabólicamente inactivas y extremadamente más resistentes a condiciones de estrés ambiental que las células vegetativas de su misma especie, incluyendo calor, salinidad, acidez, radiación, falta de oxígeno y/o de agua, baja disponibilidad de nutrientes, congelación y descongelación, presencia de solventes orgánicos y agentes oxidantes, radiación UV así como la depredación por protozoos (McKenney y col. 2013; Setlow 2014b). Las esporas están continuamente percibiendo señales del entorno que les rodea con el fin de detectar la presencia de nutrientes mediante receptores en la membrana interna (Setlow 2014a; Moir y Cooper 2015). Cuando las condiciones son apropiadas, la espora germina y surge una célula vegetativa. La transición entre la espora latente y la célula vegetativa se divide en cuatro etapas principales (Figura 2): activación, etapas de germinación I y II, y crecimiento de la espora (Moir y Cooper 2015). La activación es un proceso reversible que puede desencadenarse tras la exposición a calor o a ciertas sustancias químicas, y que hace que los receptores sean más accesibles o receptivos a los agentes germinantes debido, probablemente, a cambios conformacionales reversibles en dichos receptores (Setlow 2014a). Estos agentes incluyen los llamados germinantes "nutrientes" como aminoácidos, azúcares, nucleósidos de purina y sales inorgánicas, y los germinantes "no-nutrientes" como el dipicolinato de cálcico (Ca^{2+} -ADP), dodecilamina, lisozima, altas presiones o fragmentos de peptidoglicano (Moir y Cooper 2015). Las etapas de germinación, en cambio, son procesos irreversibles en los que participan distintas

enzimas de la espora, se rompe el estado de latencia y hay actividad metabólica endógena. En estas etapas, la espora pierde varias de sus características como la refringencia y la resistencia a agentes físicos y químicos. Finalmente, en la etapa de crecimiento se reanuda el metabolismo y la síntesis de macromoléculas en la célula, e incluye el hinchamiento de la espora, la salida de la célula vegetativa por la rotura de las cubiertas, la replicación del ADN y la primera división celular que origina la nueva célula vegetativa que da comienzo al ciclo vegetativo.

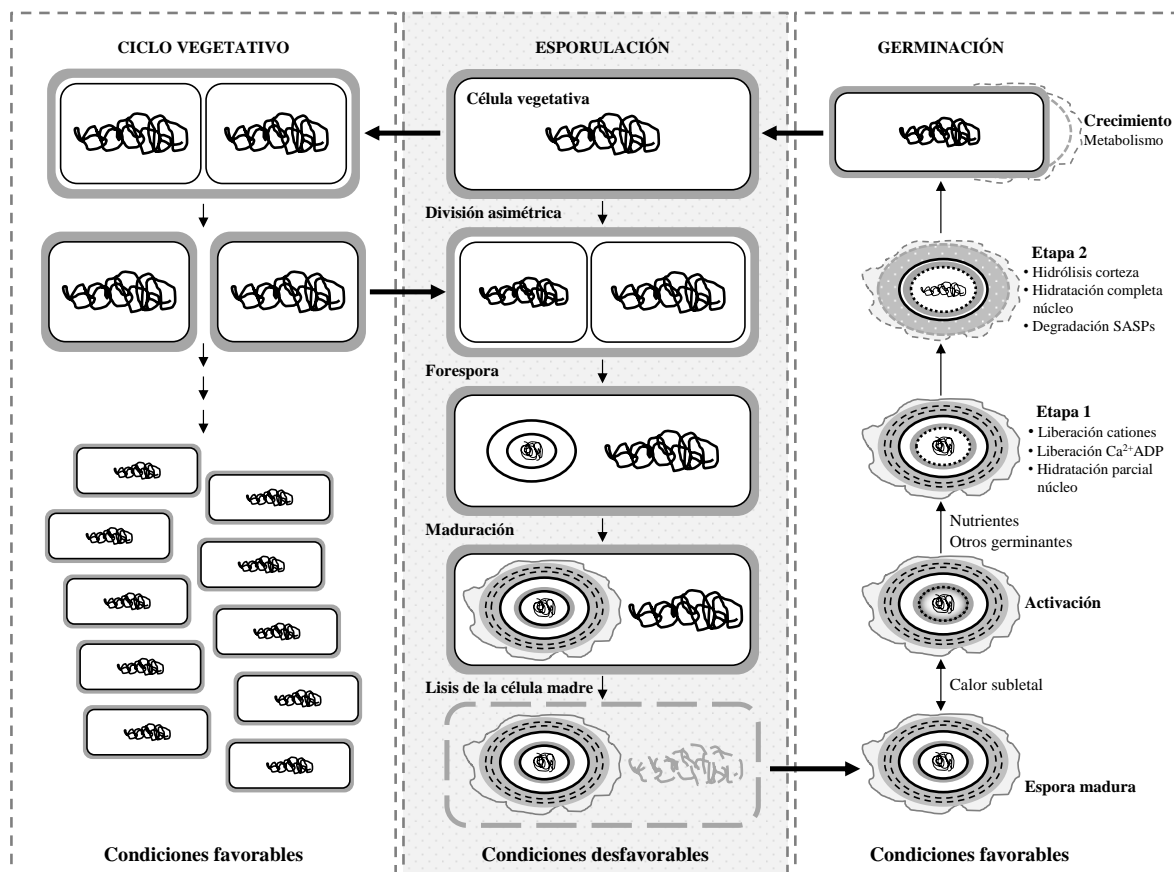


Figura 2. Ciclo de vida de las bacterias formadoras de esporas. ADP (ácido dipicolínico) y SASPs (del inglés "small acid-soluble proteins"). Fuente: Adaptado de Garde y col. (2017).

2.2. Importancia de *Clostridium* spp. en productos lácteos

Las bacterias formadoras de esporas como *Clostridium* spp. son una preocupación significativa para la industria láctea ya que las esporas poseen una gran ubicuidad, pueden entrar en la cadena de producción desde numerosas fuentes (granja, leche cruda, equipos de la planta de procesado, etc...), pueden adherirse a los equipos de procesado y formar biofilms, son muy resistentes al calor, a la deshidratación y a los desinfectantes, por lo que sobreviven a los

tratamientos térmicos y de procesado de la leche y productos lácteos, y persisten durante la cadena de producción, afectando considerablemente la seguridad y/o calidad del producto final. Los tratamientos térmicos pueden activar incluso la germinación de las esporas de *Clostridium*, que comienzan entonces su fase metabólicamente activa de crecimiento y multiplicación en el producto, incluso a temperaturas de refrigeración o maduración. En última instancia, debido a su omnipresencia en la naturaleza y a los altos niveles en los que se encuentran frecuentemente en distintos nichos de las granjas lecheras, resulta imposible eliminar el riesgo de contaminación de esporas en la leche.

Pese a que no son frecuentes, *C. botulinum* y *C. perfringens* son las principales especies de *Clostridium* implicadas en las intoxicaciones con productos lácteos. En los últimos años, las toxinas de *Clostridium* (incluidas las producidas por *C. botulinum*, *C. perfringens* y *Clostridium* spp. inespecíficas) estuvieron implicadas en el 6,52% (valores medios de 2010 a 2015) de los casos totales de brotes de intoxicación alimentaria de evidencia sólida en la Unión Europea (UE) (EFSA 2012, 2013, 2014, 2015a, b, 2016), pero ninguno de estos brotes se relacionó con el consumo de leche o productos lácteos. Existen datos anteriores que relacionan al menos unos 20 casos de botulismo humano en la UE con el consumo de productos lácteos contaminados, con una tasa de mortalidad media de un 17,9% (Lindström y col. 2010). Según estos autores, la falta de estudios sobre la prevalencia y el nivel de contaminación de *C. botulinum* en leche y productos lácteos indican una presencia ocasional y un bajo número de esporas en los mismos. *C. perfringens* se ha detectado en una amplia variedad de alimentos como consecuencia de la contaminación con el suelo o la materia fecal donde reside (EFSA 2005). A pesar de ello, muy pocos brotes se han asociado al consumo de productos lácteos (Bennett y col. 2013; McAuley y col. 2014; Doyle y col. 2015). *C. perfringens* también se ha detectado en fórmulas infantiles (Barash y col. 2010), pero nunca se ha atribuido la aparición de la enfermedad al consumo de estos productos.

Por otro lado, las bacterias del ácido butírico, un grupo de bacterias principalmente alterantes pertenecientes al género *Clostridium* como *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* y *Clostridium beijerinckii*, destacan por su implicación en el deterioro de productos lácteos, causando graves pérdidas económicas y/o daño a la reputación de las empresas. Estas especies, fermentadoras de lactato y productoras de gas, se han asociado con defectos de hinchazón tardía en queso tras la germinación de las esporas y el crecimiento de las células

vegetativas (Garde y col. 2013), dando como resultado la aparición de defectos de textura, sabor y olor en el queso, como se detallará a continuación. *Clostridium sporogenes*, aunque no se considera una bacteria del ácido butírico, también puede producir gas en el ambiente anaerobio del queso debido a su metabolismo proteolítico (Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2011a).

3. La hinchazón tardía del queso

La hinchazón tardía o fermentación butírica aparece en los quesos semanas o incluso meses después de su fabricación (Figura 3), a pesar del control de temperatura en las cámaras de maduración. Es una de las mayores causas de alteración en quesos curados y semicurados de vaca, oveja o cabra, y sus mezclas, originando defectos de sabor, aroma y textura (McSweeney y Fox 2004), y tiene un impacto económico adverso en la producción de queso. La fermentación butírica, responsable de la hinchazón tardía, se produce como consecuencia del crecimiento en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium* capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Figura 4), como ya se ha mencionado. El hidrógeno formado, insoluble en agua, da lugar a la hinchazón del queso muy fácil y rápidamente (Fröhlich-Wyder y Bachmann 2007). A presión atmosférica, cuando se produce 1 g de ácido butírico (a partir de 2 g de ácido láctico), se liberan 1000 ml de gas (CO_2 e H_2) (Fröhlich-Wyder y Bachmann 2007). Como resultado de la fermentación butírica, la matriz del queso a menudo no es capaz de soportar la presión del gas generado y aparecen ojos irregulares, rajaduras y/o grietas (Figura 3), acompañados muchas veces de un sabor y olor desagradables provocados por los ácidos producidos. Así, en queso, el ácido acético se ha asociado con notas de olor penetrantes y a vinagre, y el ácido butírico con notas de olor a rancio, fecales y a sudor (Curioni y Bosset 2002). También se ha descrito la presencia de ácido propiónico (olor penetrante, a gas y a quemado) en quesos con hinchazón tardía, siendo su producción cepa-dependiente (Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2011b).

Además del ácido láctico, *Clostridium* es capaz de metabolizar azúcares residuales no utilizados por las bacterias lácticas, así como el ácido cítrico, presentes en el queso (Garde y col. 2012a). Aparte del impacto negativo de la hinchazón debido al deterioro de las características sensoriales del queso y del rechazo del consumidor, las grietas formadas también pueden interferir en el proceso de loncheado o corte del queso previo a su venta. Todo esto da lugar a que el queso afectado, si bien no presenta un problema de seguridad alimentaria, no pueda ser

comercializado, lo que genera importantes pérdidas económicas para las industrias queseras. Aunque *C. tyrobutyricum* ha sido considerada como la principal especie responsable de la hinchazón tardía del queso, también se ha asociado la aparición de este defecto con la presencia de *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* en el queso (Klijn y col. 1995; Cocolin y col. 2004; Le Bourhis y col. 2005, 2007; Garde y col. 2011a).



Figura 3. Queso curado de oveja con hinchazón tardía. Fuente: Garde y col. (2017).

Algunos parámetros del queso como el pH y el contenido en ácidos propiónico y butírico presentan una fuerte correlación con la presencia de hinchazón tardía en el queso, especialmente cuando *C. tyrobutyricum* es el responsable del defecto (Le Bourhis y col. 2005; 2007). Así, se ha observado un aumento en los valores de pH de quesos hinchados como consecuencia de la desacidificación resultante de la actividad metabólica de *Clostridium* (Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2012a). La determinación cuantitativa de azúcares y ácidos orgánicos en el queso podría servir para monitorizar el crecimiento de *Clostridium* y su metabolismo en el queso. En un estudio realizado en quesos Manchego, aquellos con hinchazón tardía mostraron menores niveles de lactosa, galactosa, ácido láctico y ácido cítrico que los quesos sin hinchazón, lo que sugiere un consumo de estos compuestos por cepas de *Clostridium* en los quesos hinchados (Garde y col. 2012a). Por otra parte, las concentraciones de los ácidos acético y butírico fueron significativamente más elevadas en los quesos Manchego hinchados que en los no hinchados debido a la fermentación butírica. Los niveles de ácido butírico han sido también investigados en otras variedades de queso con hinchazón tardía como Saint-

Nectaire (Mayenobe y col. 1983), Gouda (Mayenobe y col. 1983; Klijn y col. 1995), Grana Padano (Cocolin y col. 2004), Emmental, Gruyère, Comté, Beaufort y Ossau-Iraty (Le Bourhis y col. 2005). Aunque la hinchazón tardía se ha asociado generalmente con altas concentraciones de ácido butírico, existen algunas excepciones (Cocolin y col. 2004; Le Bourhis y col. 2005).

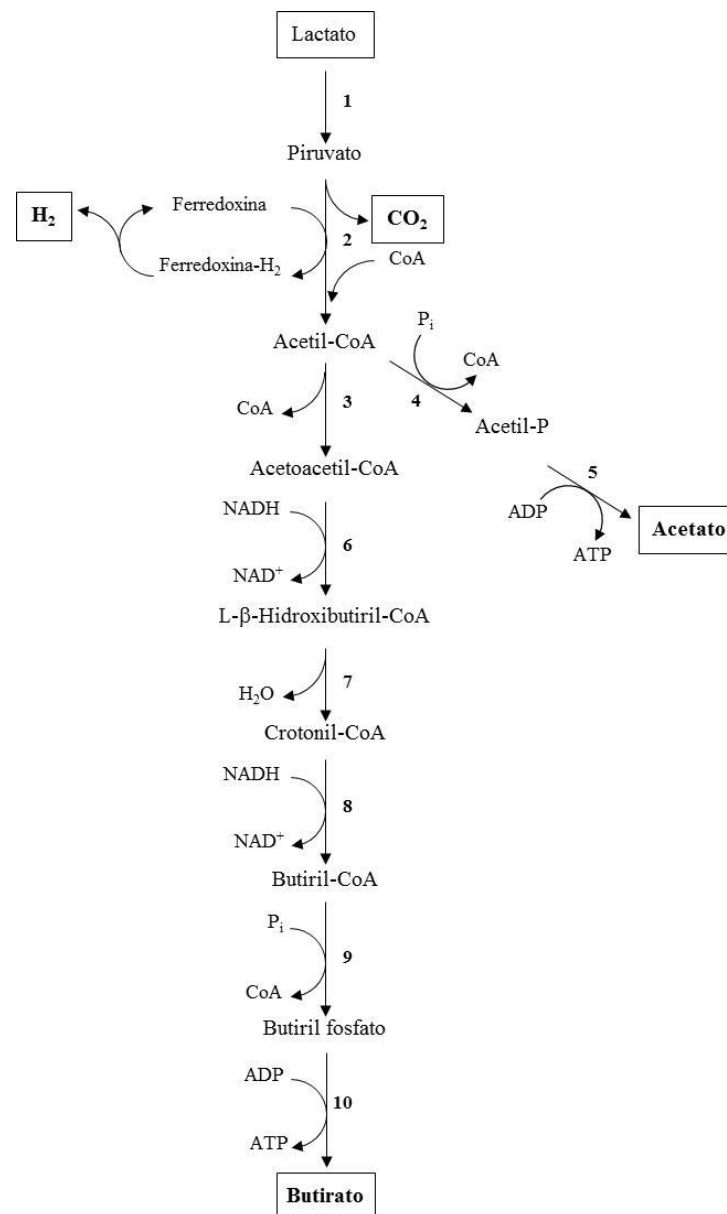


Figura 4. Fermentación del lactato por *Clostridium tyrobutyricum*. Las enzimas involucradas son: 1, lactato deshidrogenasa NADH-independiente; 2, piruvato-ferredoxina oxidorreductasa; 3, tiolasa; 4, fosfotransacetilasa; 5, acetato quinasa; 6, L-β-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa; 7, L-3-hidroxiacil-CoA hidrolasa; 8, butiril-CoA deshidrogenasa; 9, fosfotransbutirilasa; 10, butirato quinasa. Fuente: Garde y col. (2013).

Sin embargo, es difícil establecer un nivel crítico general de ácido butírico como indicador de la hinchazón tardía ya que depende de factores como la variedad y el tiempo de maduración del queso. Debe tenerse en cuenta que el contenido en ácido butírico aumenta con el tiempo de maduración como resultado de la lipólisis, y que la producción de ácido butírico por *Clostridium* en queso y en leche es cepa-dependiente (Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2011b). La fracción volátil de los quesos con hinchazón tardía, aparte de los ácidos orgánicos ya mencionados, permanece poco caracterizada, así como la contribución específica de las diferentes especies de *Clostridium* a la producción de sabores y olores desagradables relacionados con la hinchazón tardía. Hasta la realización de la presente Tesis Doctoral, solo se había investigado la fracción volátil de un queso hinchado de leche de oveja artificialmente contaminado con esporas de *C. beijerinckii* (Garde y col. 2011a), en el que se observó un aumento de la abundancia relativa de 23 compuestos volátiles debido a la actividad metabólica de *C. beijerinckii* (Garde y col. 2011a).

3.1. Fuentes de contaminación de *Clostridium* spp. en leche y queso

Para desarrollar una estrategia efectiva en el control de la contaminación de la leche y el queso por esporas de *Clostridium* spp. es fundamental conocer previamente las posibles fuentes de contaminación, así como sus vías de transmisión. Las esporas de *Clostridium* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. El suelo suele ofrecer condiciones de crecimiento perfectas para *Clostridium* spp. (ambiente anaerobio, abundantes nutrientes y alto contenido en agua) considerándose la fuente inicial de contaminación de los forrajes verdes. Si éstos son ensilados, se pueden dar buenas condiciones para el desarrollo de *Clostridium*, especialmente en aquellos silos sin excesiva acidez ni una gran aireación (Brändle y col. 2016). La principal fuente de contaminación de la leche es el ensilado de mala calidad que ha sufrido una fermentación butírica y contiene un alto número de esporas de *Clostridium*. Tras la ingestión del ensilado contaminado, las esporas son capaces de sobrevivir a su paso a través del tracto digestivo del rumiante y acumularse en el estiércol y los elementos que forman parte del lecho, desde donde pueden pasar a las ubres y de éstas a la leche, fundamentalmente en el momento del ordeño (Dasgupta y Hull 1989; Te Giffel y col. 2002; Vissers y col. 2006, 2007; Julien y col. 2008). Otra posibilidad es la contaminación de las ubres desde el suelo durante el

pastoreo de los animales. Una limpieza previa de las ubres justo antes del ordeño reduce solo en parte la suciedad adherida a las mismas y las posibles esporas (Visser y Driehuis 2009).

Las esporas de *Clostridium* presentes en el queso proceden de la leche contaminada, y se mantienen en estado latente en el queso hasta que se dan condiciones de germinación adecuadas. Como las esporas resisten el proceso de pasteurización de la leche, tanto los quesos elaborados con leche cruda como pasteurizada son susceptibles de sufrir la hinchazón tardía, siempre y cuando las esporas sean capaces de germinar a células vegetativas metabólicamente activas. Es importante tener en cuenta que un bajo número de esporas en la leche puede desencadenar el problema (0,5-10 esporas/ml de leche), aunque la sola presencia de *Clostridium* en queso no es suficiente para que se produzca la hinchazón. La concentración de ácido láctico y sal, el pH, la humedad, el contenido graso, el tiempo y temperatura de maduración, y la presencia de otros microorganismos influyen de manera crítica en el desarrollo de *Clostridium* en el queso (Goudkov y Sharpe 1965).

3.2. Incidencia de *Clostridium* spp. en leche y queso

El número de esporas de *Clostridium* encontradas en la leche cruda es generalmente bajo, de 0,04 a 100 esporas/ml en leche de vaca (Goudkov y Sharpe 1965; Bermúdez y col. 2016; Driehuis y col. 2016; Brändle y col. 2017) y de 0,36 a 240 esporas/ml en leche de oveja (Scintu y col. 2004; Garde y col. 2011a; Arias y col. 2013; Turchi y col. 2016), y muestra una dependencia estacional. En general, en la leche de vaca los recuentos de esporas más altos se han observado en invierno (Goudkov y Sharpe 1965; Dasgupta y Hull 1989) o en invierno y en verano (Bermúdez y col. 2016), lo que se ha asociado a una alimentación del ganado con ensilado en estas estaciones, principal fuente de contaminación de la leche por *Clostridium*, como se ha mencionado anteriormente. En algunos casos se han descrito efectos estacionales significativos dependiendo de las especies de *Clostridium* (Feligini y col. 2014; Bermúdez y col. 2016). En leche de oveja, se han observado mayores recuentos de esporas en verano (Scintu y col. 2004), en verano que en invierno, y en invierno que en otoño o primavera (Garde y col. 2011a), o en otoño y verano (Turchi y col. 2016), aunque no se ha encontrado de momento una relación clara entre el tipo de alimentación de las ovejas y los recuentos de esporas de *Clostridium* en leche. A pesar del bajo número de esporas de *Clostridium* en leche, su presencia ha sido detectada oscilando su incidencia desde el 16 al 100% de las muestras analizadas (Goudkov y

Sharpe 1965; Garde y col. 2011b; Arias y col. 2013; Feligini y col. 2014; Reindl y col. 2014; Chaturvedi y Shukla 2015; Driehuis y col. 2016; Turchi y col. 2016). Las especies de *Clostridium* más comunes encontradas en la leche cruda variaron en cada estudio, pero se identificaron *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. perfringens* y *Clostridium tertium* (Arias y col. 2013; Feligini y col. 2014; Reindl y col. 2014; Chaturvedi y Shukla 2015; Bermúdez y col. 2016; Driehuis y col. 2016; Turchi y col. 2016). Además, estas especies se han detectado en cuajada de queso Grana Padano (Feligini y col. 2014).

Se ha descrito una correlación entre los recuentos de esporas de *Clostridium* y la incidencia de hinchazón tardía en quesos Cheddar (Goudkov y Sharpe 1965), tipo suizo (Dasgupta y Hull 1989) y Manchego (Garde y col. 2011a). En el caso del queso Manchego, el mayor porcentaje de quesos con hinchazón se registró en los elaborados en verano (0,63% de la producción de verano), de acuerdo con los mayores recuentos medios de esporas de las muestras de leche de esa estación (Garde y col. 2011a). Sin embargo, se estimó que la proporción de quesos Manchego producidos en primavera con hinchazón tardía fue de un 0,40%, a pesar del bajo recuento de esporas en leche en primavera. Estos resultados indicarían que existen otros factores involucrados en el desarrollo de la hinchazón tardía en queso además del recuento de esporas en leche. A pesar de la alta incidencia de esporas de *Clostridium* en las muestras de leche de oveja, la incidencia global de este defecto en quesos Manchego fue baja. El uso frecuente de lisozima por los productores de queso Manchego podría haber contribuido a reducir la aparición del defecto.

El número de esporas de *Clostridium* en quesos con hinchazón tardía osciló entre 25 y $1,1 \times 10^5$ esporas/g en quesos de leche de vaca (Dasgupta y Hull 1989; Le Bourhis y col. 2005) y entre 0,36 y $2,4 \times 10^3$ esporas/g en quesos de leche de oveja (Le Bourhis y col. 2005; Garde y col. 2011a). En quesos Grana con hinchazón tardía, el 47,5% de los aislados se identificaron como *C. tyrobutyricum*, el 45% como *C. sporogenes* y el 7,5% como *C. butyricum* (Matteuzzi y col. 1977). En quesos Manchego con hinchazón, se identificaron el 78,9%, 10,3%, 9,0% y 1,8% de los aislados como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum*, respectivamente, y se aisló más de una especie del 40% de los quesos con este defecto (Garde y col. 2011a). Por otro lado, se ha detectado ADN de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii* directamente en quesos con hinchazón mediante técnicas basadas en PCR o secuenciación masiva, sin realizar aislamientos previos (Klijn y col. 1995; Cocolin y

col. 2004; Le Bourhis y col. 2005; Bassi y col. 2015). La presencia de más de una especie y/o cepas de *Clostridium* en quesos con hinchazón tardía sugieren que este defecto puede no ser el resultado de la actividad metabólica de una sola especie, sino que depende de la acción sinérgica de varias especies y/o cepas de *Clostridium*. Se ha descrito que la asociación de *C. beijerinckii* o *C. sporogenes* con *C. tyrobutyricum* incrementa la fermentación butírica y el grado de alteración del queso (Le Bourhis y col. 2007). Garde y col. (2011b) también observaron un efecto sinérgico sobre la producción de ácido butírico y gas en leche al combinar una cepa de *C. beijerinckii* con una cepa de *C. tyrobutyricum* o de *C. sporogenes*. Además, según lo descrito por Bassi y col. (2015), la interacción de *Clostridium* spp. con el resto de la microbiota del queso puede ser crucial para la aparición de hinchazón tardía en el queso. Se sabe que el crecimiento de *Clostridium* se ve favorecido por la presencia de otros microorganismos en el queso como coliformes, lactococos, leuconostocs, lactobacilos y propionibacterias (Goudkov y Sharpe 1965).

3.3. Detección de *Clostridium* spp. en queso

El método convencional para enumerar esporas de *Clostridium* spp. en queso implica el calentamiento de la muestra, para destruir las células vegetativas e inducir la germinación de las esporas, combinado con la técnica del número más probable (NMP), basada en la producción de gas que se produce en condiciones anaeróbicas como consecuencia del crecimiento y metabolismo de *Clostridium* en un medio que contiene lactato como fuente de carbono. El resultado obtenido con esta técnica se puede confirmar verificando la capacidad para fermentar el lactato de las bacterias aisladas de los tubos positivos con gas. La identificación de los aislados de *Clostridium* spp. de los tubos positivos requiere ensayos adicionales sobre cultivos puros, tales como la determinación de la posición de las endosporas, el perfil de fermentación de carbohidratos y el perfil de producción de ácidos orgánicos volátiles y no volátiles (Ingham y col. 1998). La enumeración mediante el método del NMP y la caracterización fenotípica posterior son laboriosas y requieren mucho tiempo, y a veces la discriminación entre especies de *Clostridium* es difícil o imposible (Cato y col. 1986). Por estas razones, se han desarrollado métodos moleculares, más rápidos y fiables, para la detección e identificación de los agentes causantes de la hinchazón tardía del queso. La Tabla 1 recoge los métodos utilizados en la detección de *Clostridium* spp. en queso, así como sus principales ventajas e inconvenientes.

Mediante la caracterización genotípica se ha conseguido identificar con éxito hasta el nivel de especie distintos aislados de *Clostridium* spp. procedentes de quesos con hinchazón, usando hibridación ADN-ADN con sondas de ARN ribosomal 16S (Klijn y col. 1994), análisis de restricción del ADN ribosomal 16S amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés “amplification of 16S ribosomal DNA restriction analysis”) (Garde y col. 2011a), y una PCR multiplex (Cremonesi y col. 2012). También se han tipificado aislados de *Clostridium* spp. mediante electroforesis de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) (Garde y col. 2012b).

Además, se han desarrollado métodos basados en PCR para la detección e identificación de *Clostridium* spp. directamente en el queso sin requerir un aislamiento previo (Klijn y col. 1995; Cocolin y col. 2004; Le Bourhis y col. 2005). Klijn y col. (1995) detectaron la presencia de *C. tyrobutyricum* en 12 quesos Gouda con hinchazón empleando una PCR anidada, y en 4 de ellos también se detectó *C. beijerinckii*. Mediante PCR combinada con electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE, por sus siglas en inglés) se detectó la presencia de *Clostridium* spp. en quesos Grana Padano con fermentaciones anómalas (Cocolin y col. 2004). Las especies detectadas fueron *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*, y en alguno de los quesos se detectó más de una especie. La aplicación de una técnica combinada de PCR y electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (PCR-TTGE, por sus siglas en inglés) permitió identificar a *C. beijerinckii* y *C. tyrobutyricum* como las especies de *Clostridium* predominantes en 20 quesos comerciales con hinchazón tardía, siendo ambas especies detectadas en más de la mitad de los quesos (Le Bourhis y col. 2005).

Recientemente, Bassi y col. (2013) han desarrollado una PCR a tiempo real que ha permitido cuantificar el número total de esporas y células vegetativas de *C. tyrobutyricum* presentes en quesos Grana Padano con hinchazón. El mismo grupo de investigación ha estudiado la comunidad de *Clostridium* spp. involucrada en el deterioro de 83 quesos Grana Padano, su relación con otros miembros de la microbiota del queso, y el efecto que la lisozima tiene sobre ellos, mediante la aplicación de PCR-DGGE, PCR a tiempo real y secuenciación masiva (Bassi y col. 2015). *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum* fueron las especies de *Clostridium* predominantes, *S. thermophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* favorecieron el desarrollo de *C. tyrobutyricum*, mientras que *Lb. delbrueckii* favoreció el de *C. butyricum*. La lisozima frenó el desarrollo de *C. tyrobutyricum*, resultando beneficioso para el desarrollo de *C. butyricum*.

Tabla 1. Métodos empleados para la detección de *Clostridium* spp. en queso

Métodos	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
NMP + caracterización fenotípica	No requiere equipamiento especial	Laborioso, requiere mucho tiempo, inespecífico	Ingham y col. 1998
NMP + caracterización genotípica	Más rápido que la caracterización fenotípica y específico	Requiere aislamiento previo	Klijn y col. 1994 Garde y col. 2011a Cremonesi y col. 2012
PFGE	Identificación hasta el nivel de cepa	Laborioso y requiere mucho tiempo	Garde y col. 2012b
Métodos de detección directos basados en la PCR	No requiere aislamiento previo, específico y sensible. Cuantificación (PCR a tiempo real)	Requiere equipamiento especial	Klijn y col. 1995 Cocolin y col. 2004 Le Bourhis y col. 2005 Bassi y col. 2013 Bassi y col. 2015

Fuente: adaptado de Garde y col. 2013.

3.4. Estrategias de control para prevenir la hinchazón tardía del queso

Para evitar la aparición de hinchazón tardía en el queso se puede actuar a nivel preventivo en las granjas o a nivel paliativo en las queserías. Las medidas preventivas en las granjas están dirigidas a minimizar el número de esporas en la leche de tanque. En las queserías, las estrategias más comunes se basan en reducir el número de esporas ya presentes en la leche mediante métodos físicos, y/o en la adición a la leche de sustancias inhibitorias frente a *Clostridium*.

3.4.1. Medidas preventivas en la granja

La primera medida para prevenir la aparición de hinchazón tardía en el queso es minimizar la contaminación de la leche con esporas de *Clostridium* spp., mediante la implementación de buenas prácticas en la granja, ya que es imposible eliminar el riesgo de contaminación de la leche con esporas debido a que su presencia es ubicua en la naturaleza (Visser y col. 2006, 2007). La adopción de medidas de control en la granja comprende, a grandes rasgos, el empleo de ensilado de buena calidad para la alimentación del ganado, la aplicación de rutinas de limpieza de los establos, de los equipos de ordeño y de la sala de ordeño, así como la limpieza y tratamiento de las ubres antes del ordeño (Doyle y col. 2015).

3.4.2. Eliminación de esporas mediante tratamientos físicos

La bactofugación y la microfiltración de la leche son los métodos físicos más comúnmente utilizados en las industrias queseras para prevenir la hinchazón tardía del queso cuando las esporas están ya presentes en la leche, y se basan en reducir su número antes de la fabricación de queso (Te Giffel y van der Horst 2004; Tamime y col. 2006; Faccia y col. 2013; Fernández y col. 2013; Kumar y col. 2013).

Durante la bactofugación, las esporas y las células bacterianas se separan de la leche mediante una centrifugación a alta velocidad (aproximadamente $9000 \times g$), debido a su diferencia de densidad. El sedimento obtenido de la bactofugación, concentrado en esporas y bacterias, es también rico en proteínas de la leche, en particular caseínas, por lo que se esteriliza y se reincorpora a la leche para minimizar las pérdidas del rendimiento quesero. La bactofugación de la leche elimina entre el 88-92% de las bacterias y el 94-98% de las esporas anaerobias, pero esta reducción puede no ser suficiente para prevenir la hinchazón tardía. Mediante una doble bactofugación se puede lograr un ligero aumento en la reducción de esporas. Por otro lado, con la microfiltración se eliminan bacterias, esporas y, también células somáticas de la leche mediante la filtración de la misma a través de una membrana con un tamaño de poro de entre 0,2-2 μm . Este proceso permite que la mayoría de las micelas de caseína pasen a través de la membrana de microfiltración, pero los glóbulos de grasa de la leche son demasiado grandes para pasar (1-10 μm) por lo que la microfiltración solo se puede aplicar a leche desnatada. Con esta técnica se consigue una reducción del 99% del número de esporas, similar al de la doble bactofugación.

El mayor inconveniente que presentan tanto la bactofugación como la microfiltración es que requieren un equipo específico, que a su vez supone un coste adicional de funcionamiento, y todo ello se traduce en una inversión de capital que no está al alcance de todas las queserías.

3.4.3. Empleo de aditivos

Los aditivos alimentarios utilizados en quesería para evitar la hinchazón tardía tienen distintos modos de acción, dependiendo de si actúan sobre las células vegetativas o las esporas. Los aditivos se pueden utilizar en combinación con tratamientos físicos como la bactofugación, lo que permite reducir la cantidad necesaria de los mismos. Uno de los aditivos empleados actualmente para prevenir la hinchazón tardía en el queso es el nitrato, que se añade a la leche como KNO_3 (E-252) o NaNO_3 (E-251), a una dosis máxima permitida de 150 mg/kg de leche (Directiva 2006/52/CE del Parlamento y Consejo Europeo). Durante la maduración del queso, el nitrato es reducido a nitrito por la enzima xantina-oxidasa de la leche (Nieuwenhof 1977) así como por algunas bacterias nitrato reductoras presentes en el queso (bacterias coliformes y lactobacilos). El nitrito es el compuesto que inhibe realmente el desarrollo de *Clostridium* en el queso. Aunque su mecanismo de acción no está totalmente claro, parece que impide el aumento de tamaño de la spora y su división en la última fase de la germinación, y también la actividad de algunas enzimas necesarias para la supervivencia de las células vegetativas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el nitrito puede reaccionar con aminos secundarios del queso formando nitrosaminas cancerígenas, por lo que su uso no está permitido en algunos países y, además, la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea recomienda minimizar su uso como aditivo alimentario (EFSA 2010).

Otro aditivo que se utiliza en las queserías es la lisozima (E-1105), que se obtiene de la clara de huevo de gallina. Se añade a la leche de fabricación según el principio de *quantum satis* (Directiva 95/2/CE del Parlamento y Consejo Europeo). La lisozima se une a las caseínas de la leche, quedando así retenida en la cuajada, donde es capaz de hidrolizar los enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) de los polisacáridos de la pared celular de las células vegetativas de *Clostridium*, una vez que las esporas germinan. La lisozima también actúa inhibiendo el aumento de tamaño de la spora en la última fase de la germinación. La adición de lisozima a la leche de fabricación, como la de nitrato, es una solución sencilla, económica, y que no requiere equipamiento

específico. Sin embargo, la lisozima puede plantear riesgos en sujetos alérgicos al huevo (Fremont y col. 1997) y por ello su uso está prohibido en algunas variedades de queso con Denominación de Origen.

3.4.4. Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas

Para resolver algunas de las desventajas previamente mencionadas y satisfacer la creciente demanda de alimentos con menos aditivos por parte de los consumidores, se han estudiado nuevas estrategias para prevenir la hinchazón tardía del queso. Una de ellas se basa en el empleo de bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas, que además de facilitar la supervivencia de la cepa productora, contribuyen a la conservación del alimento. Se trata de uno de los sistemas de bioconservación más seguros, ya que las bacterias lácticas y sus metabolitos se han consumido durante muchos años sin efectos adversos.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias y son activas frente a bacterias filogenéticamente próximas. La nisina, producida por algunas cepas de *L. lactis*, es la bacteriocina mejor conocida y considerada sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) (Ronk 1988), y autorizada como conservante (E-234) en más de 50 países. Las esporas de *Clostridium* spp. son particularmente susceptibles a la nisina, y parecen ser más sensibles que las células vegetativas (Delves-Broughton y col. 1996). La nisina actúa formando poros en la membrana de las células vegetativas e inhibe el aumento de tamaño de la espora en la última fase de la germinación. La adición de nisina a quesos fundidos con objeto de evitar alteraciones por *Clostridium* spp. fue su primera aplicación como conservante y actualmente sigue siendo una de las principales aplicaciones de esta bacteriocina en la industria láctea. Se considera que las concentraciones de nisina eficaces para controlar el desarrollo de especies de *Clostridium* no patógenos se deben situar entre 250 y 500 UI/g, y entre 500 y 1000 UI/g para controlar el desarrollo de *C. botulinum* y la producción de toxinas (Somers y Taylor 1987).

El empleo de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas se ha ensayado con éxito en la prevención de la hinchazón tardía del queso (Rilla y col. 2003; Anastasiou y col. 2009;

Martínez-Cuesta y col. 2010; Garde y col. 2011b). *L. lactis* subesp. *lactis* IPLA 729, productor de nisina Z, empleado como fermento en la elaboración del queso artesanal asturiano Vidiago, permitió controlar el desarrollo de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 con mayor efectividad que el nitrato potásico (Rilla y col. 2003). La macedocina producida por *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 inhibió la germinación de las esporas de *C. tyrobutyricum* inoculadas en leche fermentada, elaborada y almacenada imitando la condiciones de elaboración y maduración del queso Kasseri (Anastasiou y col. 2009). El empleo de *L. lactis* IFPL 3593, productor de lacticina 3147, como adjunto en la elaboración de queso, previno la aparición de hinchazón tardía en queso semiduro inoculado con esporas de *Clostridium* (Martínez-Cuesta y col. 2010). *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, productor de nisina Z y lacticina 481 y empleado como fermento, fue capaz de controlar el crecimiento de *C. beijerinckii* INIA 63 y prevenir la hinchazón tardía causada por éste en quesos modelo artificialmente contaminados con esporas de este microorganismo, incluso en condiciones favorables para la germinación y crecimiento de *Clostridium* (Garde y col. 2011b). Sin embargo, el empleo del productor de bacteriocinas *Lactobacillus gasseri* K7 como adjunto en la elaboración de queso, solo retrasó el desarrollo de *C. tyrobutyricum* y la aparición de hinchazón (Bogovic-Matijasic y col. 2007). *Lactobacillus plantarum* TF711, productor de plantaricina TF711, tampoco previno la hinchazón causada por *C. sporogenes*, cuando se utilizó como adjunto en la elaboración de queso (González y Zárata 2015).

3.4.5. Otras estrategias de prevención

Otra estrategia que ha sido investigada para prevenir la aparición de hinchazón tardía en el queso es la irradiación, que reduce el número de microorganismos presentes en los alimentos tratados al dañar su ADN, incluso irreversiblemente (Velasco y col. 2011). La aplicación de una dosis de irradiación de 3 kGy al queso provocó una reducción del 96% de las esporas de *C. tyrobutyricum*. Aunque esta dosis perjudicó ligeramente el olor y el sabor del queso, éste se consideró aceptable para el consumo tras su evaluación sensorial por un panel de catadores.

Basándose en la actividad anti-clostridium del aceite esencial de romero demostrada en estudios *in vitro* (Librán y col. 2013), la adición de este aceite esencial a la leche ha sido otra de las estrategias estudiada recientemente con el objetivo de prevenir la hinchazón tardía (Moro y

col. 2015). En el queso elaborado con el aceite esencial de romero no se detectó la presencia de *Clostridium* spp. a los 5 meses de maduración, mientras que el queso control presentó un recuento superior a 3 unidades logarítmicas/g.

Más recientemente, Consentino y col. (2015) han propuesto como estrategia para prevenir la hinchazón tardía, añadir leche de burra a la leche de vaca para la elaboración de queso, basándose en el alto contenido en lisozima que tiene la leche de burra (1,0 – 3,7 mg/ml vs. 0,13 µg/ml). La adición de un 8% de leche de burra previno la hinchazón tardía en los quesos elaborados con leche artificialmente contaminada con esporas de *C. tyrobutyricum* durante 120 días de maduración. Además, el empleo de leche de burra no afectó a la aceptabilidad del producto tras ser evaluado sensorialmente por 80 consumidores habituales de queso.

4. *Lactobacillus reuteri*, productor de reuterina

Lactobacillus reuteri es una bacteria láctica heterofermentativa que forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, habiendo sido también aislado del tracto genitourinario, la cavidad oral, la leche materna, y de varios alimentos, incluyendo los productos lácteos (Casas y Dobrogosz 2000; Vollenweider y Lacroix 2004; Hou y col. 2015). *Lb. reuteri* se utiliza como probiótico en fórmulas infantiles en polvo, leches fermentadas, yogures, quesos, helados, zumos y también se presenta en comprimidos (Vollenweider y Lacroix 2004). Existen diversos trabajos sobre los efectos beneficiosos de este microorganismo, su capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal humano y su empleo como suplemento alimenticio (Casas y Dobrogosz 2000; Mukai y col. 2002; Vollenweider y Lacroix 2004; Weizman y col. 2005; Stevens y col. 2011). Entre los efectos beneficiosos destaca su papel en la prevención y/o tratamiento de distintas enfermedades gastrointestinales como son los trastornos funcionales digestivos, distintos tipos de diarrea, la enfermedad inflamatoria intestinal, la infección por *Helicobacter pylori* y el cólico del lactante.

Los efectos probióticos de *Lb. reuteri* se han asociado fundamentalmente con la capacidad de esta bacteria para adherirse a la mucosa intestinal, modular las actividades enzimáticas en el colon, competir con microorganismos patógenos, modificar la microbiota intestinal, modular el sistema inmune, y producir compuestos antimicrobianos como la

reuterina (Schaefer y col. 2010; Stevens y col. 2011). En este sentido, Morita y col. (2008) demostraron la producción de reuterina *in vivo* en intestino de ratón tras la administración oral de una cepa de *Lb. reuteri* productora de la misma.

4.1. Reuterina

Algunas cepas de *Lb. reuteri* son capaces de producir reuterina (3-hidroxipropionaldehído, 3-HPA), un potente compuesto antimicrobiano activo frente a microorganismo patógenos y alterantes alimentarios, incluyendo bacterias gram-positivas y gram-negativas, levaduras y mohos (Talarico y col. 1988; Cleusix y col. 2007; Schaefer y col. 2010; Vollenweider y col. 2010; Stevens y col. 2011). Con respecto a *Clostridium* spp., la reuterina ha demostrado ser activa frente a *C. sporogenes*, *C. difficile* y *Clostridium clostridioforme* (Chung y col. 1989; Cleusix y col. 2007; Schaefer y col. 2010).

La reuterina es un metabolito intermediario producido durante el metabolismo anaeróbico del glicerol a 1,3-propanodiol (Figura 5). La transformación de glicerol a 3-HPA está catalizada por la enzima glicerol deshidratasa que es cobalamina (vitamina B12) dependiente (Talarico y Dobrogosz 1990). La producción y secreción de reuterina por *Lb. reuteri* parece estar directamente relacionada con su capacidad para producir vitamina B12 (Morita y col. 2008). De hecho, los genes implicados en la biosíntesis de la reuterina y la cobalamina se estructuran en dos operones, *pdu* y *cbi-cob*, respectivamente, adyacentes en el cromosoma de *Lb. reuteri*, y constituyen una isla genómica (Morita y col. 2008).

Lb. reuteri es capaz de producir y secretar grandes cantidades de reuterina cuando crece en un medio con alta concentración de glicerol y baja concentración de glucosa (Schaefer y col. 2010; Engels y col. 2016). La producción de 3-HPA también se ha descrito en *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium* y otras especies de *Lactobacillus*, pero en estos microorganismos la reuterina es inmediatamente reducida a 1,3-propanodiol por acción de la enzima 1,3-propanodiol deshidrogenasa que es NADH dependiente (Engels y col. 2016). En *Lb. reuteri* también puede producirse esta última transformación, lo que supone un aporte extra de energía para la célula al restaurar su equilibrio redox (Stevens y col. 2011).

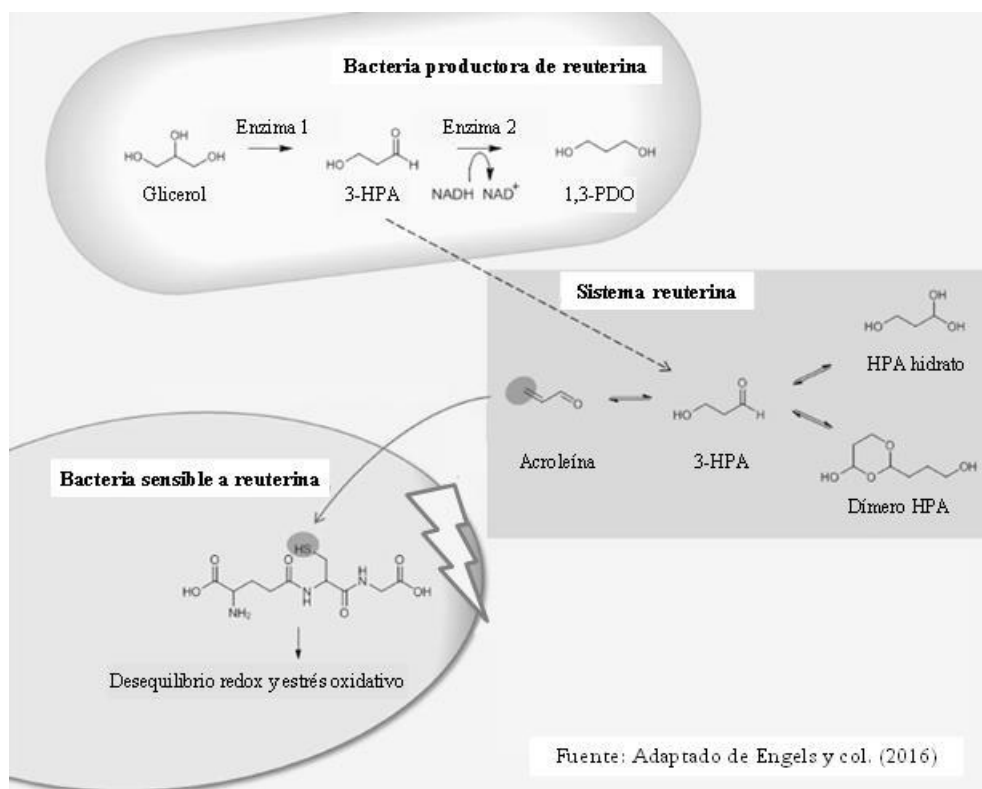


Figura 5. Formación de 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) y 1,3-propanodiol (1,3-PDO) a partir de glicerol. El sistema reuterina y su mecanismo de acción. Enzima 1: glicerol deshidratasa; enzima 2: 1,3-propanodiol deshidrogenasa.

El grupo aldehído de la reuterina es muy reactivo, por lo que en medio acuoso el 3-HPA experimenta una dimerización e hidratación reversibles, estableciéndose un sistema en equilibrio entre el 3-HPA, el dímero HPA y el HPA hidratado (Figura 5). Este equilibrio depende de la concentración de reuterina, siendo la forma hidratado, seguida de la forma aldehído las que predominan a las concentraciones que se alcanzan en los sistemas biológicos (Vollenweider y col. 2003). Las condiciones del medio como el pH y la temperatura también afectan a la composición del sistema reuterina (Vollenweider y col. 2010; Stevens y col. 2011). Schaefer y col. (2010) y Vollenweider y col. (2010) atribuyeron la actividad antimicrobiana de la reuterina a la forma aldehído, y propusieron como mecanismo de acción el estrés oxidativo que esta forma induce en las células al interactuar con los grupos tiol de pequeñas moléculas y proteínas. Sin embargo, en un estudio reciente se ha atribuido la actividad antimicrobiana de la reuterina a la acroleína (Engels y col. 2016). Este estudio revela una conversión espontánea y rápida del 3-HPA a acroleína por deshidratación en condiciones fisiológicas (Figura 5). Por ello,

los autores proponen la redefinición del término reuterina como un sistema formado por el 3-HPA, el dímero HPA, el HPA hidrato, y también por la acroleína.

La reuterina es una sustancia neutra, soluble en agua, resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas, y estable en un amplio rango de pH (2-8) y a temperaturas de refrigeración (Axelsson y col. 1989; Vollenweider y Lacroix 2004; Langa y col. 2013; Ortiz-Rivera y col. 2017). Por ello, y por su amplio espectro inhibitorio, se ha propuesto su uso como agente antimicrobiano en alimentos, entre ellos, en productos lácteos.

4.2. La reuterina en productos lácteos

En productos lácteos, se ha descrito un efecto tanto bactericida como bacteriostático (dependiendo de la cepa y concentración de reuterina) al emplear la reuterina como aditivo en leche, cuajada y queso Cottage, sobre patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* o *Campilobacter jejuni* (El-Ziney y Debevere 1998; Arqués y col. 2004, 2008 a, b; 2011).

El uso de la reuterina como aditivo en la elaboración de queso presenta varios inconvenientes tales como su posible pérdida en el desuerado, la pérdida de actividad durante la maduración, y que su uso como aditivo alimentario aún no está legislado. Sin embargo, la producción de reuterina *in situ* por *Lb. reuteri* en el alimento podría solventar parte de estos inconvenientes. En el momento de realizar el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral, solo Langa y col. (2013) habían comprobado que *Lb. reuteri* era capaz de sobrevivir y producir reuterina en yogur y sistemas de queso modelo al suplementar la leche de fabricación con glicerol, pero se desconocía el posible efecto de la producción *in situ* sobre microorganismos patógenos o alterantes o sobre las características del producto lácteo. Posteriormente, Angiolillo y col. (2014) describieron que la aplicación de un recubrimiento de alginato sódico con *Lb. reuteri* y glicerol sobre la superficie del queso Fior di Latte prolongó su calidad microbiológica y por tanto su vida útil. Muy recientemente, Ortiz-Rivera y col. (2017) han observado un efecto bactericida de la reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* sobre *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Li. monocytogenes*, *S. aureus* y *Penicillium expansum* en yogur. Por otra parte, tras la optimización de la producción de reuterina en queso modelo por *Lb. reuteri*

(Martín-Cabrejas y col. 2017), Langa y col. (2018) han observado una fuerte actividad antimicrobiana de la misma frente a *Li. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7.

5. Altas presiones, alimentos y microorganismos

Entre los nuevos métodos de conservación alternativos o complementarios a los tradicionales tratamientos térmicos, la tecnología de altas presiones es probablemente la más desarrollada comercialmente. Esta tecnología permite la inactivación de microorganismos patógenos y alterantes, y prolongar la vida útil de los alimentos, con bajo impacto en su calidad nutritiva y sensorial, aunque en la práctica dicho impacto depende de las condiciones específicas del tratamiento y del alimento implicado.

La aplicación de altas presiones hidrostáticas como procedimiento para conservar la leche y reducir el número de bacterias presentes en la misma se describió ya a finales del siglo XIX (Hite 1899). Sin embargo, debido a las limitaciones en el campo de la ciencia de los materiales, esta tecnología no comenzó a desarrollarse con fines comerciales hasta finales del siglo XX en Japón. En 2009, la FDA aprobó esta tecnología como método no térmico de pasteurización para su aplicación en el procesado de alimentos, y hoy se utiliza en muchos países como Estados Unidos, México, Corea del Sur, Japón y España (Balasubramaniam y col. 2015; Wang y col. 2016). Se estima que el mercado de alimentos procesados por altas presiones mueve más de 10.000 millones de dólares, fundamentalmente por la comercialización de productos como salsas y patés, alimentos preparados, carnes, mariscos, zumos y batidos (Huang y col. 2014, Wang y col. 2016).

El procesado de alimentos con altas presiones implica someter al producto, una vez envasado en un material flexible y sumergido en un líquido transmisor (generalmente agua debido a su baja compresibilidad), a presiones entre 100 y 800 MPa (Balasubramaniam y col. 2015). Existen dos principios fundamentales en los que se basa la aplicación de las altas presiones:

La ley de Pascal o principio isostático, por la que una presión externa aplicada sobre un fluido incompresible confinado se transmite de forma instantánea y uniforme en todas las direcciones, independientemente de su tamaño y forma, haciendo que todo él reciba el mismo tratamiento.

El principio de Le Chatelier, que indica que un sistema en equilibrio al sufrir un cambio (de concentración, presión, volumen o temperatura) se ajusta para contrarrestar dicho cambio. Así, al aumentar la presión se verán favorecidas las reacciones que impliquen una reducción de volumen.

Los equipos de alta presión hidrostática empleados en el procesamiento de alimentos (Figura 6) están formados, fundamentalmente, por una cámara de presurización (vasija cilíndrica de acero de elevada resistencia), un generador de presión generalmente constituido por una bomba hidráulica y un sistema multiplicador de presión, y un sistema de control y registro del proceso. Los tres parámetros críticos a controlar en el diseño de cualquier tratamiento por altas presiones son la presión, el tiempo y la temperatura.



Figura 6. Equipos de altas presiones comercializados por la empresa española Hiperbaric. Fuente: www.hiperbaric.com/es/

5.1. Efecto sobre los componentes de los alimentos

Las altas presiones no afectan a los enlaces covalentes debido a su baja compresibilidad (Balasubramaniam y col. 2015; Wang y col. 2016). Por ello, las moléculas pequeñas como

vitaminas, aminoácidos y compuestos responsables del color y sabor, en principio, no se ven afectados por este tratamiento, por lo que el valor nutricional del alimento se mantiene. Sin embargo, las altas presiones sí afectan a las uniones no covalentes, tales como las fuerzas de Van der Waals, las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrógeno. Por tanto, la estructura de moléculas de elevado peso molecular, como proteínas, polisacáridos y lípidos, sí puede verse alterada por las altas presiones, pudiendo dar lugar a la desnaturalización en el caso de las proteínas, a cambios de fase en el caso de lípidos, o a la alteración de las propiedades gelificantes de los polisacáridos (Yamamoto 2017).

5.2. Efecto sobre los microorganismos

La resistencia de los microorganismos a las altas presiones es muy variable ya que depende de varios factores: el tipo de microorganismo, su fase de crecimiento, las condiciones del entorno y los parámetros (presión, tiempo y temperatura) del tratamiento de presurización (Huang y col. 2014).

En general, las altas presiones han mostrado tener mayor efecto sobre microorganismos con mayor grado de organización y complejidad estructural. Los microorganismos procariotas son más barorresistentes que los eucariotas. Los protozoos y los parásitos son especialmente sensibles a la presión, y presiones relativamente bajas logran su inactivación (Rivalain y col. 2010). Los mohos y levaduras tienen una resistencia intermedia, siendo los micelios de los mohos muy sensibles, mientras que las esporas son más resistentes (Martínez-Rodríguez y col. 2014). Los virus poseen un amplio rango de resistencia a las altas presiones debido a su gran diversidad estructural, siendo los poliovirus los más barorresistentes, soportando presiones de hasta 600 MPa (Grove y col. 2008). La barorresistencia de las formas vegetativas de las bacterias depende de su fisiología, morfología y fase de crecimiento, siendo en general las gram-positivas más resistentes que las gram-negativas, los cocos más resistentes que los bacilos, y las bacterias en fase estacionaria más resistentes que en fase exponencial (Huang y col. 2014). Otro factor que influye es la cepa, ya que existen importantes diferencias de barorresistencia entre cepas de la misma especie bacteriana. Por otro lado, las esporas bacterianas son extremadamente resistentes a las altas presiones, pudiendo soportar presiones superiores a 1000 MPa, por lo que se han estudiado distintas estrategias para su destrucción, como la eliminación directa mediante la combinación de altas presiones con altas temperaturas o la inducción de la germinación de las

esporas seguida de la inactivación de las formas vegetativas (Huang y col. 2014; Balasubramaniam y col. 2015; Wang y col. 2016).

La sensibilidad de los microorganismos a las altas presiones es diferente según la composición y propiedades del alimento en el que se encuentren (Huang y col. 2014). En este sentido, se ha descrito que las bacterias son más barorresistentes a pH neutros que a pH ácidos y básicos. Por otra parte, algunos componentes de los alimentos como las proteínas, los azúcares y los lípidos pueden ejercer un efecto baroprotector, aumentando la resistencia de los microorganismos a la presión.

Los parámetros del tratamiento de alta presión tienen un efecto directo sobre la supervivencia de los microorganismos. En general, cuanto mayor sea la presión, el tiempo de aplicación de la misma y la temperatura, mayor será el efecto sobre los microorganismos. La aplicación de presiones moderadas (400–600 MPa) a temperatura ambiente o de refrigeración es efectiva para inactivar una gran variedad de microorganismos patógenos y alterantes, tales como células vegetativas de bacterias, levaduras, hongos y virus (Balasubramaniam y col. 2015). Sin embargo, para la inactivación de esporas es necesaria la combinación de alta presión (400–600 MPa) con altas temperaturas ($> 70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

La inactivación de los microorganismos por la aplicación de altas presiones se produce por la acumulación de daños en distintas partes de la célula que cuando exceden la capacidad de reparación, acaba dando lugar a la lisis microbiana. En algunos casos el daño celular puede ser reparado si las condiciones del medio son favorables (Rendueles y col. 2011). Los efectos que las altas presiones tienen sobre los microorganismos pueden clasificarse principalmente en cambios en la membrana celular, cambios morfológicos, alteraciones bioquímicas y genéticas.

La membrana celular es una de las estructuras de la célula más afectada por el tratamiento con alta presión. La integridad estructural se desestabiliza y se altera la permeabilidad de la membrana, lo que provoca la destrucción celular y fugas del material citoplasmático. La bicapa lipídica sufre transiciones de fase bajo presión, con cristalización de fosfolípidos. Esto da lugar a un descenso de la fluidez de la membrana, lo que puede causar su ruptura y la desnaturalización de las proteínas unidas a ella, provocando la pérdida de su funcionalidad. Esto mismo sucede en el interior de la célula, en la membrana de algunos orgánulos (Rendueles y col. 2011; Huang y col. 2014).

Las altas presiones pueden causar cambios morfológicos en las bacterias y en sus estructuras internas como el alargamiento de la célula, el cese del movimiento debido a cambios estructurales, la separación de la pared celular de la membrana, la compresión de vacuolas, y el descenso del número de ribosomas y su disociación (Abe 2007).

A nivel bioquímico, las altas presiones provocan la desnaturalización de las proteínas, incluyendo proteínas de membrana y enzimas, ya que destruyen su estructura terciaria y cuaternaria, mantenidas por enlaces no covalentes (Rendueles y col. 2011; Huang y col. 2014). Este efecto implica la inhibición de procesos vitales para la célula.

Las altas presiones también afectan a la funcionalidad del material genético, inhibiendo los mecanismos de replicación y transcripción del ADN (Huang y col. 2014).

5.3. Efecto sobre la espora bacteriana

Como ya se ha mencionado anteriormente, las esporas bacterianas son muy resistentes a las altas presiones. Sin embargo, la germinación inducida por las altas presiones provoca que las esporas pierdan su resistencia inherente y puedan ser inactivadas con tratamientos posteriores (Black y col. 2007a; Sarker y col. 2015). Clouston y Wills (1969) fueron los primeros en reconocer el potencial de las altas presiones para inactivar esporas al observar que inducían la germinación de las esporas de *Bacillus pumilus* a presiones por encima de los 50 MPa, comprobando que las presiones más efectivas para inducir la germinación se encontraban por debajo de los 100 MPa (Gould y Sale 1970).

En *Bacillus*, se han propuesto dos mecanismos de germinación inducida por altas presiones, uno a presiones relativamente bajas (50-300 MPa) que activan receptores de nutrientes situados en la membrana interna de la espora, y otro a presiones más elevadas (400-1000 MPa), que implica la liberación del ácido dipicolínico a través de la apertura de unos canales específicos situados en la membrana interna de la espora (Black y col. 2007a; Sarker y col. 2015; Doona y col. 2016). La activación de los receptores de nutrientes da lugar a la liberación del ácido dipicolínico y éste, en ambos mecanismos de germinación, activa las enzimas que degradan la corteza. Existe una diferencia entre ambos mecanismos, y es que a bajas presiones se activan las enzimas que degradan las proteínas SASPs que acomplejan el ADN de la espora, lo que explica que esporas de una misma cepa cuya germinación haya sido

inducida por bajas presiones sean más sensibles a un segundo tratamiento de alta presión que las inducidas a presiones moderadas (Sarker y col. 2015). Por otra parte, hay que tener en cuenta que existen umbrales de presión que pueden inactivar las enzimas implicadas en la germinación de las esporas.

En *Clostridium* existen menos estudios sobre la germinación de sus esporas y sobre su comportamiento frente a las altas presiones. En los últimos años se han llevado a cabo algunos estudios que han ayudado a esclarecer en parte estas materias, y que han revelado que existen diferencias con respecto a lo descrito para las esporas de *Bacillus* (Paredes-Sabja y col. 2011; Xiao y col. 2011; Sarker y col. 2015; Doona y col. 2016). En *Clostridium* existen menos secuencias en su genoma que codifiquen para receptores de germinantes que en el caso de *Bacillus*, y no se ha descrito la existencia de proteínas que faciliten el transporte de nutrientes a través de las capas más externas de la espora como en el caso de *Bacillus* (Xiao y col. 2011). Además, existen especies de *Clostridium*, como *C. difficile*, que no tiene receptores de nutrientes (Paredes-Sabja y col. 2011). Por otra parte, en el caso de *Clostridium* spp. se han descrito dos mecanismos implicados en la hidrólisis de la corteza durante la germinación de la espora (Paredes-Sabja y col. 2011). Uno de ellos similar al descrito previamente para *Bacillus* (como es el caso de *C. sporogenes*), y otro presente en la mayoría de especies de *Clostridium* estudiadas (*C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, etc...) en el que intervienen otras enzimas hidrolíticas que no se activan por el ácido dipicolínico. Por ello, en aquellas cepas o especies de *Clostridium* que tengan un mecanismo de hidrólisis de la corteza no dependiente del ácido dipicolínico, es muy probable que la germinación de sus esporas no pueda ser inducida por la aplicación de altas presiones (Sarker y col. 2015).

Recientemente, Doona y col. (2016) han estudiado el efecto de las altas presiones sobre las esporas de *C. difficile* y *C. perfringens*. La aplicación de 150 MPa dio lugar a la liberación de ácido dipicolínico solo en el caso de *C. perfringens*, aunque únicamente completaron la germinación el 30% de las esporas. Las esporas de ambos microorganismos liberaron ácido dipicolínico cuando se aplicó un tratamiento de 550 MPa, completando la germinación el 2 y 12% de las esporas de *C. difficile* y *C. perfringens*, respectivamente. Los autores atribuyeron estas diferencias de comportamiento con respecto a lo descrito para *Bacillus*, a los distintos mecanismos implicados en la germinación de sus esporas. En primer lugar, como ya se ha mencionado, *C. difficile* no posee receptores de nutrientes en la membrana interna de sus

esporas, por lo que la aplicación de presiones bajas no indujo la germinación de las mismas. En este microorganismo, los germinantes se unen a receptores que se encuentran en las capas externas de la espora y que no son sensibles a la presión, y la germinación se inicia con la degradación de la corteza, a la que le sigue la liberación del ácido dipicolínico. En el caso de *C. perfringens*, sí que posee receptores de nutrientes en la membrana interna de la espora pero, a diferencia de *Bacillus* e igual que en el caso de *C. difficile*, la hidrólisis de la corteza precede a la liberación de ácido dipicolínico, aunque se ha sugerido que podría seguir la misma ruta de germinación que *Bacillus* pero de manera minoritaria.

5.4. Alta presión, esporas y queso

Existen numerosos estudios sobre la aplicación de las altas presiones en queso, la mayoría de ellos encaminados a la inactivación de microorganismos patógenos como *E. coli*, *S. aureus*, *Li. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Salmonella enterica*, y *Y. enterocolitica* (Martínez-Rodríguez y col. 2012). Por otra parte, se han llevado a cabo varios estudios en los que se ha investigado la aplicación de las altas presiones para acelerar la maduración del queso, y también para prevenir la sobremaduración. Sin embargo, existen muy pocos trabajos sobre la aplicación de las altas presiones en queso con el fin de inactivar bacterias formadoras de esporas. De hecho, solo existen dos trabajos sobre la inactivación de microorganismos esporulados en queso mediante la aplicación de altas presiones, concretamente frente a *Bacillus* spp. (Capellas y col. 2000; López y col. 2003). En estos estudios se aplicaron dos ciclos de altas presiones, un ciclo de germinación seguido de un ciclo de inactivación. Capellas y col. (2000) trataron quesos Mató inoculados con esporas de *Bacillus subtilis* a 60 MPa durante 210 min a 25, 30 ó 40 °C para inducir la germinación seguido de un tratamiento de inactivación a 500 MPa durante 15 min, lo que causó letalidades entre 2,7 y 4,9 unidades logarítmicas dependiendo de la temperatura aplicada. En un estudio similar en quesos modelo inoculados con esporas de *Bacillus cereus*, la aplicación de un ciclo de germinación (60 MPa/ 30 °C/ 210 min) previo al ciclo de inactivación (500 MPa/ 30 °C/ 15 min) dio lugar a una mayor inactivación de esporas que en el caso de la aplicación de un solo tratamiento, lográndose una reducción de 2 unidades logarítmicas en el recuento de esporas con respecto al control (López y col. 2003).

6. Bacteriófagos y endolisinas fágicas

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente a las bacterias, son muy específicos, y en el caso de los fagos líticos producen la lisis y muerte de la bacteria hospedadora, pudiendo por ello ser considerados como agentes antimicrobianos (Endersen y col. 2014). Los fagos son los entes más abundantes del planeta, se han aislado de todos los ambientes explorados, y su ubicuidad se debe a que proliferan en los ambientes que colonizan sus huéspedes bacterianos (Salmond y Fineran 2015). Los bacteriófagos fueron descubiertos de forma independiente por Frederick Twort en 1915 y por Félix d'Herelle en 1917, quién además hizo grandes aportes a su estudio. Los fagos se clasifican en base al tipo de ácido nucleico que contienen, a su morfología y a su secuencia genómica. Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés, <https://talk.ictvonline.org/>) la mayoría de los fagos pertenecen al orden *Caudovirales*, y se caracterizan por presentar cola y contener ADN de doble cadena. El orden se subdivide en tres familias en función de la morfología de la cola: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. La familia *Myoviridae* incluye los fagos que tienen una cola larga y contráctil. La familia *Siphoviridae* es la más amplia del orden *Caudovirales*, y los fagos de esta familia se caracterizan por tener una cola larga pero no contráctil. Por último, en la familia *Podoviridae* se agrupan los fagos que presentan una cola corta.

Según su ciclo biológico, los bacteriófagos se clasifican en líticos o virulentos y lisogénicos o atemperados (Endersen y col. 2014; Salmond y Fineran 2015). El primer paso del ciclo infectivo de un bacteriófago es el reconocimiento y la adsorción del fago a la superficie de la bacteria huésped (Figura 7). La siguiente fase es la inyección del material genético en el citoplasma bacteriano. Tras esta etapa, el fago puede realizar un ciclo lisogénico, en el que integra su ADN en el material genético de la bacteria huésped (profago), o puede realizar un ciclo lítico en el que se forman nuevas partículas víricas que son liberadas tras la lisis bacteriana. El profago permanece en un estado reprimido dentro del genoma bacteriano, replicándose junto a éste en el proceso de división celular. Sin embargo, ciertos estímulos ambientales o agentes externos pueden inducir el ciclo lítico en el profago, resultando en la lisis de la célula huésped. El ciclo lítico consta de varias etapas entre las que se incluyen: la replicación del genoma vírico, la síntesis de proteínas víricas implicadas en la formación de las nuevas partículas fágicas y en la lisis celular, el empaquetamiento del ADN y ensamblaje de las nuevas partículas, y la

destrucción de las células bacterianas por lisis y liberación de la progenie viral (Figura 7). La lisis bacteriana requiere de la acción conjunta de dos enzimas codificadas en el genoma del fago: la endolisina, que actúa degradando el peptidoglicano de la pared celular, y la holina, que genera poros en la membrana citoplasmática permitiendo el acceso de la endolisina a la pared celular.

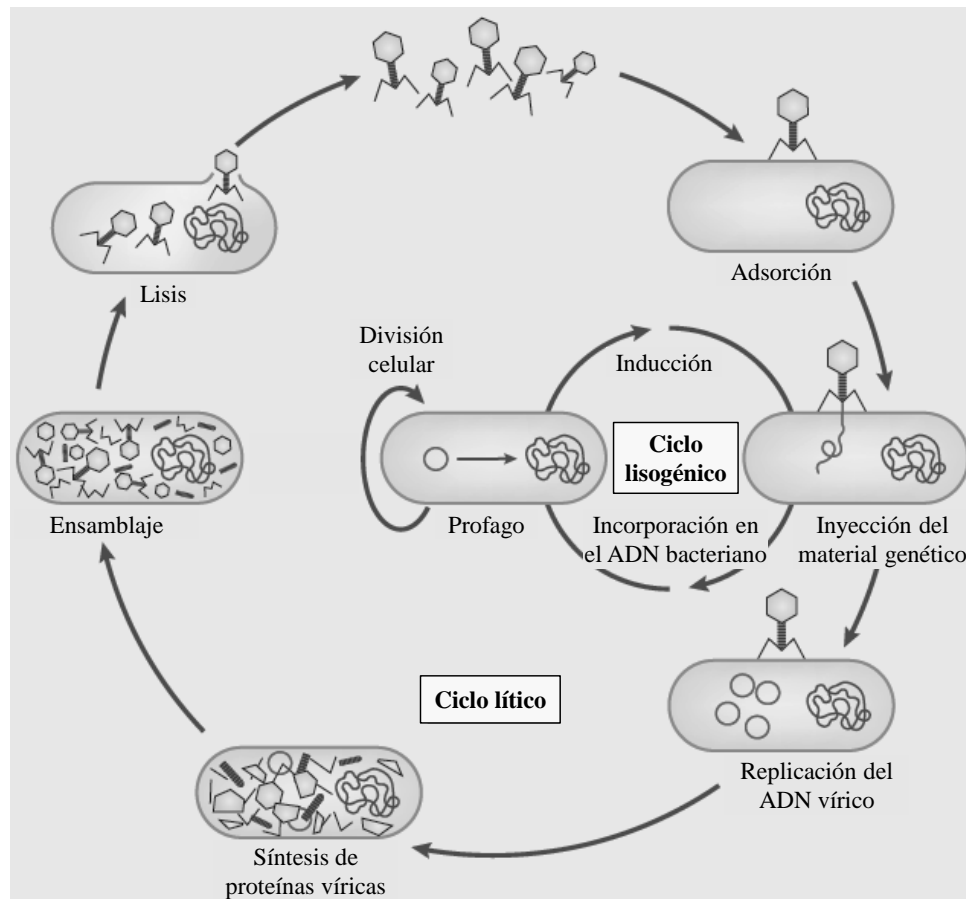


Figura 7. Ciclos biológicos de un bacteriófago (Fuente: Salmond y Fineran 2015).

Los bacteriófagos seleccionados como agentes terapéuticos o de biocontrol deben ser fagos líticos, ya que los atemperados al recombinarse con el ADN de la bacteria huésped, pueden transferir material genético de una bacteria a otra, incluyendo genes de virulencia o de resistencia a antibióticos (Endersen y col. 2014). Por otra parte, las bacterias que contienen un profago en su genoma se hacen inmunes al mismo y a fagos relacionados. Además, los fagos lisogénicos solo provocan una lisis parcial de la población de la bacteria huésped. Sin embargo, los fagos líticos son capaces de replicarse exponencialmente en la bacteria huésped y lisar completamente la población bacteriana.

6.1. Endolisinas fágicas

Las endolisinas, como ya se ha mencionado, son proteínas codificadas por los bacteriófagos que degradan el peptidoglicano de la pared celular, y que tienen como misión lizar la célula huésped para permitir la liberación de la progenie viral (Fischetti 2010; Schmelcher y col. 2012; Rodríguez-Rubio y col. 2015).

La estructura de las endolisinas difiere en función de si proceden de fagos que infectan bacterias gram-positivas o gram-negativas (Schmelcher y col. 2012; Rodríguez-Rubio y col. 2015). La mayoría de las endolisinas de bacterias gram-negativas presentan una organización globular con un dominio catalítico (EAD, del inglés "enzymatically active domain") pero sin un dominio de unión a la pared celular (CBD, del inglés "cell binding domain"). Sin embargo, la mayoría de las endolisinas de fagos que infectan bacterias gram-positivas presentan una estructura modular (Figura 8) en la que se distingue un dominio de unión y un dominio catalítico, que suelen ser el dominio C- y N-terminal, respectivamente (Fischetti 2010; Schmelcher y col. 2012; Rodríguez-Rubio y col. 2015).

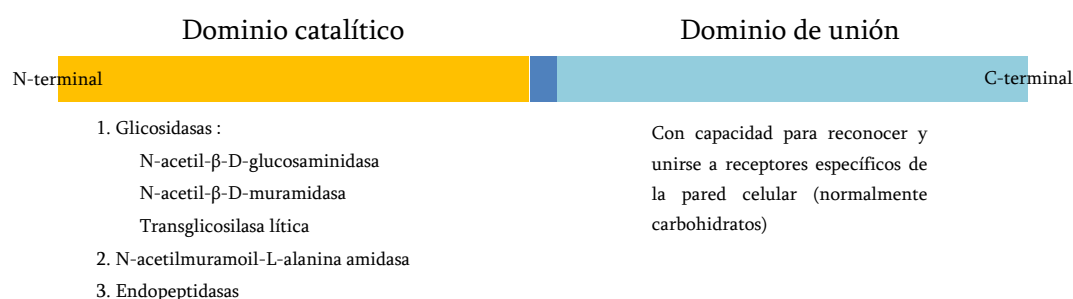


Figura 8. Estructura básica de una endolisina codificada por un bacteriófago que infecta a una bacteria gram-positiva.

En el dominio de unión reside la especificidad de las endolisinas, ya que les confiere la capacidad para reconocer y unirse a receptores específicos de la pared bacteriana, tales como los residuos de N-acetilglucosamina del peptidoglicano, y los residuos de N-acetilglucosamina y colina de los ácidos teicoicos. El dominio de unión, además, también modula la actividad de las endolisinas. Algunas de ellas necesitan el dominio de unión para ejercer su actividad lítica, mientras que otras son igual o incluso más activas sin este dominio (Schmelcher y col. 2012; Rodríguez-Rubio y col. 2015). El dominio catalítico es el responsable de romper los enlaces

presentes en la red de peptidoglicano de la pared celular, y en función de los enlaces que rompen, las endolisinas se clasifican en tres grupos: glicosidasas, amidasas y endopeptidasas (Rodríguez-Rubio y col. 2015). En el grupo de las glicosidasas se han descrito tres actividades enzimáticas: la N-acetil- β -D-glucosaminidasa que rompe el enlace β -1,4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, y la N-acetil- β -D-muramidasa y la transglicosilasa lítica que rompen el enlace β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina. La N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa hidroliza el enlace amido entre el ácido N-acetilmurámico y el primer aminoácido de la cadena peptídica del peptidoglicano, y las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos entre aminoácidos.

Las endolisinas también son capaces de provocar la lisis bacteriana desde fuera de la célula bacteriana cuando se añaden exógenamente, al menos en el caso de las bacterias gram-positivas, ya que carecen de la membrana externa presente en las bacterias gram-negativas. Por esta razón y por el aumento de resistencias bacterianas a los antibióticos, en la última década, las endolisinas han despertado un creciente interés debido al potencial que ofrecen como antimicrobianos (Schmelcher y Loessner 2016). Una alternativa a la adición directa de las endolisinas es el empleo de bacterias recombinantes productoras de las mismas (Rodríguez-Rubio y col. 2015; Guo y col. 2016; Schmelcher y Loessner 2016).

6.2. Bacteriófagos y sus endolisinas como agentes de biocontrol en la industria alimentaria

Los bacteriófagos ofrecen un gran potencial como agentes terapéuticos y en el biocontrol de microorganismos patógenos y alterantes en alimentos debido a su capacidad para lisar bacterias, a su elevada especificidad (rango de huéspedes generalmente restringido a género o especie), a que son naturales, poco costosos, se replican en el lugar de infección (facilitando el proceso bactericida), no afectan a las características sensoriales de los alimentos, son abundantes en la naturaleza e ino cuos (Fischetti 2010; Schmelcher y col. 2012; Endersen y col. 2014; Rodríguez-Rubio y col. 2015; Schmelcher y Loessner 2016). Las endolisinas también tienen un espectro de acción limitado y relativamente específico, aunque mayor que el de los fagos parentales, un efecto bactericida rápido, son inocuas y no se conoce que generen resistencias (Schmelcher y col. 2012; Rodríguez-Rubio y col. 2015). Por ello, los fagos y sus endolisinas han sido objeto de estudio en distintos campos de investigación de la medicina, la

veterinaria, la agricultura y la seguridad alimentaria. Si bien, la mayoría de los trabajos han sido llevados a cabo en el campo de la medicina, la eficacia del uso de los fagos en términos de seguridad alimentaria ha sido demostrada a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria (“de la granja a la mesa”) (Endersen y col. 2014; Rodríguez-Rubio y col. 2015). Estos trabajos incluyen la aplicación de fagoterapia en animales de granja, el uso de fagos o sus endolisinas como desinfectantes de superficies de trabajo y equipos para la eliminación de biofilms, y como bioconservantes en el producto final (alimento) para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes, y también la detección de los mismos mediante endolisinas fágicas.

Actualmente se comercializan algunos cócteles de fagos (Listex P100, ListShield, SalmoFresh, etc...) para el control de *Li. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* en algunos alimentos (Endersen y col. 2014). En leche y productos lácteos, el uso de fagos o sus endolisinas ha sido ensayado con éxito frente a *Pseudomonas*, *Salmonella* Enteritidis, *Enterobacter sakazakii*, *S. aureus*, *Li. monocytogenes* y *Mycobacterium smegmatis* (EFSA 2009; Endersen y col. 2014; Rodríguez-Rubio y col. 2015; Schmelcher y Loessner 2016; Chang y col. 2017; Van Tassell y col. 2017).

6.3. Bacteriófagos y sus endolisinas como agentes de biocontrol de *Clostridium* spp. en la industria alimentaria

La mayoría de los trabajos sobre la aplicación de los fagos y sus endolisinas frente a *Clostridium* spp. en la industria alimentaria están dirigidos a eliminar a *C. perfringens*. Zimmer y col. (2002) demostraron la actividad lítica de la endolisina Ply3626 frente a 48 cepas de *C. perfringens* y propusieron su aplicación para el control de este patógeno en aves de granja. La administración de un cóctel de fagos vehiculizado en el alimento y agua de bebida en pollos resultó ser una medida efectiva en el control de la enteritis necrótica causada por *C. perfringens* (Miller y col. 2010). Por otra parte, se ha conseguido expresar la endolisina CP25L, activa frente a *C. perfringens*, en la cepa probiótica *Lactobacillus johnsonii* FI9785, de origen aviar, y se ha sugerido el empleo de esta cepa en aves de granja para prevenir la enteritis necrótica causada por *C. perfringens* (Gervasi y col. 2014a,b).

Respecto a los fagos de *Clostridium* spp. alterantes, desde 1964 cuando Betz y Anderson aislaron 12 fagos de *C. sporogenes*, solo se ha descrito el aislamiento y secuenciación del fago

virulento Φ CTP1 (Figura 9), activo frente a *C. tyrobutyricum* (Mayer y col. 2010). Este grupo estudió la actividad de su endolisina CTP1L que resultó ser activa además frente a *C. sporogenes*. La endolisina CTP1L presenta una estructura modular con un dominio catalítico y un dominio de unión que es imprescindible para su actividad lítica. El mismo grupo de investigación estudió la actividad de la endolisina CS74L del fago ATCC 8074-B1 de *C. sporogenes*, activa también frente a *C. tyrobutyricum* y *Clostridium acetobutylicum* (Mayer y col. 2012). En este caso, el dominio de unión no resultó necesario para la actividad lítica de la endolisina CS74L. Los autores de estos dos estudios sugirieron el empleo de estas endolisinas como estrategia de control de *Clostridium* y prevención de hinchazón tardía en queso.

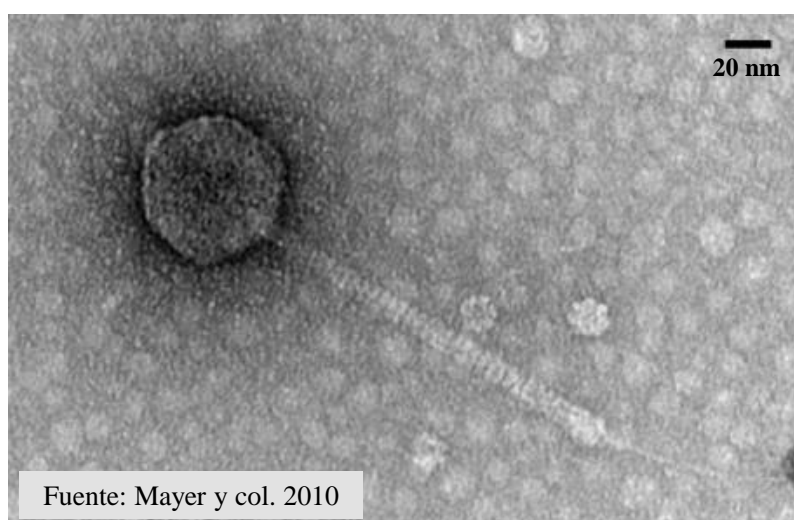


Figura 9. Micrografía electrónica de transmisión del bacteriófago virulento Φ CTP1 perteneciente a la familia *Siphoviridae* del orden *Caudovirales*, y activo frente a *Clostridium tyrobutyricum*.

6.4. Endolisinas fágicas como sistemas de detección

El desarrollo de métodos sensibles y específicos que permitan una detección rápida y fiable de microorganismos patógenos y alterantes, es esencial para garantizar la seguridad alimentaria y para evitar pérdidas económicas en las industrias alimentarias por alteración de sus productos. La extraordinaria especificidad y afinidad de unión que presenta el dominio de unión de las endolisinas, las convierte en candidatos ideales para desarrollar nuevos métodos de detección (Bai y col. 2016; Schmelcher y Loessner 2016).

Se han desarrollado distintos métodos de detección basados en la especificidad de unión de las endolisinas en combinación con una o varias técnicas como la microscopía de fluorescencia, la separación magnética, la PCR a tiempo real, la espectroscopía de impedancia electroquímica y la resonancia plasmónica de superficie (Rodríguez-Rubio y col. 2015; Bai y col. 2016; Schmelcher y Loessner 2016). Estos métodos se han centrado fundamentalmente en la detección de *Li. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* y *C. perfringens*.

En el caso de la microscopía de fluorescencia, las endolisinas o sus dominios de unión se fusionan con proteínas fluorescentes como la GFP (del inglés, "green fluorescent protein") o la EGFP (del inglés, "enhanced GFP"). Esta técnica ha sido investigada en otros microorganismos, además de los citados anteriormente, tales como *Lactobacillus fermentum* (Hu y col. 2010), *C. difficile* (Mayer y col. 2011) y *Brevibacterium flavum* (Gerova y col. 2011).

Objetivos de la Tesis Doctoral

En la presente Tesis Doctoral se planteó como objetivo principal la evaluación de distintas estrategias alternativas a las existentes hoy en día, con el fin de prevenir la hinchazón tardía causada por *Clostridium* spp. en el queso, pero sin perjudicar la calidad del mismo.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Estudio de la implicación de distintas especies de *Clostridium* en la hinchazón tardía del queso.
2. Estudio de la sensibilidad de *Clostridium* spp. a distintos antimicrobianos.
3. Estudio de la inhibición de *C. tyrobutyricum* por bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en queso, y de su efecto sobre las características del mismo.
4. Estudio de la inhibición de *C. tyrobutyricum* por el productor de reuterina *Lactobacillus reuteri* INIA P572 en queso, y de su efecto sobre las características del mismo.
5. Estudio de la inhibición de *C. tyrobutyricum* por tratamientos con alta presión en queso, y del efecto de su aplicación sobre las características del mismo.
6. Estudio de la actividad lítica de la endolisina CTP1L frente a *Clostridium* spp.
7. Estudio del potencial de la endolisina CTP1L como sistema de detección de *Clostridium* spp. en queso.

Capítulo 1

Implicación de distintas especies de *Clostridium* en la hinchazón tardía del queso

Prefacio

Como se ha descrito en la Introducción, la hinchazón tardía o fermentación butírica es una alteración de origen microbiano que se produce como consecuencia del crecimiento en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium* capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Tradicionalmente, la hinchazón tardía se ha relacionado con el crecimiento de *C. tyrobutyricum* en el queso, si bien, se ha sugerido que otras especies de *Clostridium* tales como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* podrían estar implicadas en esta alteración. Por ello, el Objetivo 1 del presente trabajo de investigación fue estudiar el grado de implicación de estas especies de *Clostridium* en la hinchazón tardía del queso.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de una publicación científica incluida en el Science Citation Index (SCI):

Publicación 1.1. Gómez-Torres N.*, Garde S.*, Peirotén A., Ávila M. (2015). Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. Food Control 56, 186-194, *co-primer autoras (revista en el primer cuartil en la categoría “Food Science & Technology”).



Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors



Natalia Gómez-Torres¹, Sonia Garde¹, Ángela Peirotén, Marta Ávila*

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2014

Received in revised form

24 March 2015

Accepted 25 March 2015

Available online 3 April 2015

Keywords:

Clostridium

Cheese

Spoilage

Late blowing defect

Volatiles

Off-flavors

ABSTRACT

The impact of autochthonous and type-strains of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium sporogenes* on spoilage (late blowing defect, LBD), physico-chemical characteristics and volatile profile of cheese has been investigated. Five semi-hard cheeses were produced from ewe milk inoculated with 10^4 spores/mL of five *Clostridium* strains and ripened for 60 d. One cheese without clostridial spores served as control. *C. tyrobutyricum* CECT 4011 and INIA 68 resulted potent cheese spoilers, and caused the appearance of the earliest and greatest symptoms of LBD, affecting cheese pH and color, and leading to accumulation of volatile compounds like butyric, propionic and pentanoic acids and some aldehydes, alcohols and esters associated with cheese rancid and pungent off-odors. Cheeses contaminated with *C. beijerinckii* INIA 63 and *C. sporogenes* INIA 71 showed milder and late LBD symptoms, and a volatile profile characterized by higher levels of 2-butanone, 2,3-butanedione and 2-butanol than the rest of cheeses. Despite cheese inoculated with *C. butyricum* CECT 361 presented a slight blown-pack at the end of ripening, it showed physico-chemical characteristics and a volatile profile similar to control cheese. The first two axes of a principal component analysis (PCA) performed for the 21 significant volatile compounds out of 38, accounting for 91% of the variability between cheeses, separated cheeses made with *C. tyrobutyricum* CECT 4011 and INIA 68, with severe LBD symptoms, from the rest of cheeses, and also differentiated control cheese and cheese made with *C. butyricum* CECT 361, from cheeses with milder LBD symptoms made with *C. beijerinckii* INIA 63 and *C. sporogenes* INIA 71.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ripening of semi-hard and hard cheeses is a slow process which involves the metabolism of residual lactose, lactate and citrate, proteolysis and lipolysis of milk components throughout microbial, enzymatic and chemical transformations of fresh curd to give rise to a delicate balance of volatile and non-volatile compounds precursors or directly implicated in cheese flavor. Lactate may be metabolized by a number of pathways to various compounds which contribute to cheese flavor or off-flavors depending on variety, microbiota and ripening conditions (McSweeney & Sousa, 2000). Some undesirable microorganisms, like spores of certain species of the genus *Clostridium*, are able to survive the milk pasteurization and cheese-making processes, remaining in the cheese paste

during ripening, where they can germinate into vegetative cells which subsequently metabolize lactate. In general, *Clostridium* metabolism of lactate includes the production of organic acids, mainly butyric acid, and some gases such as CO₂ and H₂, resulting in abnormal aroma and flavor and in cracks and slits in the cheese paste, also known as late blowing defect (LBD), a major cause of spoilage in semi-hard and hard cheeses (Garde, Ávila, Gómez, & Nuñez, 2013). The insolubility of H₂ in water is responsible for a very easy and quick cheese blowing (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007). Clostridia able to metabolize not only lactate and residual sugars in cheese, but also citric acid (Garde, Ávila, Gaya, Arias, & Nuñez, 2012). LBD persists as a major cause of spoilage due to the ubiquitous presence and resistant nature of *Clostridium* spores and since low spore counts in milk can cause LBD if cheese conditions are suitable for the germination and growth of *Clostridium*. To minimize *Clostridium* contamination and development of LBD, it is possible to act at a preventive level at the dairy farm, by minimizing milk contamination (i.e. controlling silage quality, changing the feed, improving hygiene at milking and storage) or at a palliative

* Corresponding author.

E-mail address: arribas@inia.es (M. Ávila).

¹ These authors contributed equally to this work.

Capítulo 2

Sensibilidad de *Clostridium* spp. a distintos compuestos antimicrobianos

Prefacio

Durante mucho tiempo, la adición de nitrato sódico o potásico a la leche para el control de *Clostridium* ha sido práctica habitual en las queserías. Sin embargo, en algunos países esta práctica ha sido prohibida porque el uso de nitrato comporta ciertos riesgos sanitarios debido a su transformación en nitrito que puede reaccionar con aminos secundarios del queso formando nitrosaminas cancerígenas. Otro aditivo empleado en la prevención de la hinchazón tardía es la lisozima, pero es necesario indicar la posible aparición de reacciones alérgicas a la misma. Además, el uso de estos aditivos aporta una solución parcial al problema de la hinchazón, ya que durante estudios previos realizados por nuestro grupo investigador se han recogido quesos hinchados elaborados con estos aditivos.

Por todo ello y con objeto de satisfacer la creciente demanda de los consumidores por alimentos mínimamente procesados, con menos conservantes y aditivos químicos, nos planteamos nuestro siguiente objetivo que fue estudiar el empleo de bacterias lácticas productoras de compuestos antimicrobianos (concretamente productoras de nisina o reuterina) como estrategia de bioconservación alternativa al uso de estos aditivos.

Previo al estudio de la inhibición de *Clostridium* spp. por bacterias lácticas productoras de antimicrobianos en queso, dentro del Objetivo 2 se estudió la sensibilidad de las esporas y células vegetativas de 4 especies de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes*) a nisina y reuterina en RCM y en leche mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Las CMIs de estos antimicrobianos fueron comparadas con la lisozima y el nitrito.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de una publicación científica incluida en el SCI:

Publicación 2.1. Ávila M., Gómez-Torres N., Hernández M., Garde S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. International Journal of Food Microbiology 172, 70-75 (revista en el primer decil en la categoría “Food Science & Technology”).



Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species



Marta Ávila^{a,*}, Natalia Gómez-Torres^a, Marta Hernández^b, Sonia Garde^a

^a Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Carretera de Burgos Km 119, 47071 Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2013

Received in revised form 26 November 2013

Accepted 1 December 2013

Available online 7 December 2013

Keywords:

Reuterin

Nisin

Antimicrobials

Clostridium

Spores

Vegetative cells

ABSTRACT

The butyric acid fermentation, responsible for late blowing of cheese, is caused by the outgrowth in cheese of some species of *Clostridium*, resulting in texture and flavor defects and economical losses. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of different antimicrobial compounds against vegetative cells and spores of *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* strains isolated from cheeses with late blowing defect. Minimal inhibitory concentration (MIC) for reuterin, nisin, lysozyme and sodium nitrite were determined against *Clostridium* strains in milk and modified RCM (mRCM) after 7 d exposure. Although the sensitivity of *Clostridium* to the tested antimicrobials was strain-dependent, *C. sporogenes* and *C. beijerinckii* generally had higher MIC values than the rest of *Clostridium* species. The majority of *Clostridium* strains were more resistant to antimicrobials in milk than in mRCM, and vegetative cells exhibited higher sensitivity than spores. Reuterin (MIC values 0.51–32.5 mM) and nisin (MIC values 0.05–12.5 µg/ml) were able to inhibit the growth of vegetative cells and spores of all assayed *Clostridium* strains in milk and mRCM. Strains of *C. tyrobutyricum* exhibited the highest sensitivity to lysozyme (MIC values < 0.20–400 µg/ml) and sodium nitrite (MIC values 18.75–150 µg/ml). These results suggest that reuterin and nisin, with a broad inhibitory activity spectrum against *Clostridium* spp. spores and vegetative cells, may be the best options to control *Clostridium* growth in dairy products and to prevent associated spoilage, such as late blowing defect of cheese. However, further studies in cheese would be necessary to validate this hypothesis.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Clostridium* consists of a diverse group of obligately anaerobic, Gram-positive, endospore-forming microorganisms, which are distributed in all sorts of environments such as soil, water, plants and intestinal tracts of animals and humans (Johnson, 2009). Several species can grow in a wide range of foods, including dairy products, meat and poultry products and fresh or canned fruits and vegetables, causing food spoilage and/or food poisoning in humans (Peck et al., 2004). In semi-hard and hard cheeses, the butyric acid fermentation responsible for the late blowing defect (LBD) is one of the major causes of spoilage, resulting in texture and flavor defects (McSweeney and Fox, 2004) with an unfavorable economic impact. This defect has been attributed to the outgrowth in cheese of strains belonging to *Clostridium tyrobutyricum* capable of fermenting lactic acid with production of butyric acid, acetic acid, carbon dioxide and hydrogen (Klijn et al., 1995). However, other clostridial species such as *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* and *C. butyricum* have also been shown to significantly contribute to the occurrence of LBD in cheese (Cocolin et al., 2004; Garde et al., 2011a; Le Bourhis et al., 2005, 2007).

Physical methods like bacterofugation or microfiltration of the cheese milk (García et al., 2013; Tamime et al., 2006; Te Giffel and van der Horst, 2004) may be used to remove clostridial spores and avoid LBD, but they require specific equipment and large capital expenditures. In addition, these methods modify milk composition and the reduction in the number of spores achieved may not suffice to prevent LBD in cheese. On the other hand, microfiltration can only be applied to skim milk because the milk fat globules are too large to pass through the microfiltration membrane. Consequently, the addition of *Clostridium*-inhibitory substances to milk, such as nitrate and lysozyme (Lodi, 1990; Stadhouders, 1990; van den Berg et al., 2004; Wasserfall and Teuber, 1979), is preferred by cheese makers as they are easy to use, no specific equipment is required, and it is a non-costly procedure. The addition of nitrate (E251 and E252) is permitted at a maximum amount of 150 mg/kg (expressed as sodium nitrite) in the milk during manufacture (European Parliament, 2006). As the cheese ripens, nitrate is converted to nitrite by the enzyme xanthine-oxidase, present in the milk/curd and by some nitrate reducing bacteria present in cheese (Galesloot, 1961; Nieuwenhof, 1977; Stadhouders, 1990). The nitrite, which is the actual inhibitor of the development of the spores, is in turn slowly reduced in cheese during ripening. Nonetheless, the EFSA recommends minimizing the use of nitrate and nitrite as food additives in order to keep the level of potentially carcinogenic nitrosamines as

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3476884; fax: +34 91 3572293.
E-mail address: arribas@inia.es (M. Ávila).

Prefacio

Como hemos visto en el Capítulo anterior, la reuterina y la nisina fueron capaces de inhibir el crecimiento de las células vegetativas y esporas de todas las cepas de *Clostridium*, tanto en RCM como en leche. Por ello, se procedió al estudio de la inhibición de *Clostridium* por estos antimicrobianos naturales en quesos modelo, pero en esta ocasión empleando las bacterias lácticas productoras como fermentos o adjuntos en la elaboración de los mismos.

En primer lugar, dentro del Objetivo 3 planteado en la presente Tesis Doctoral, estudiamos la eficacia de la nisina producida *in situ* por *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 en el control de *C. tyrobutyricum* y prevención de la hinchazón ocasionada por este microorganismo en quesos modelo. Este trabajo no ha sido publicado, pero hemos considerado interesante incluirlo como un apéndice del Capítulo 3 porque, aunque como veremos, los resultados no fueron los deseados, ayuda a entender el desarrollo de la Tesis.

Por otra parte, en este Capítulo hemos estudiado el empleo de *Lb. reuteri* INIA P572, productor de reuterina, como adjunto en la elaboración de queso con el fin de controlar el desarrollo de *C. tyrobutyricum* y prevenir así la aparición de hinchazón tardía en los quesos, dentro del Objetivo 4. *Lb. reuteri* es una bacteria láctica heterofermentativa que se emplea como probiótico en productos lácteos. Sus efectos probióticos se han asociado, entre otros, a la producción de compuestos antimicrobianos como la reuterina. Este antimicrobiano es un metabolito intermediario producido durante el metabolismo anaeróbico del glicerol. Por ello, en la elaboración de los quesos añadimos glicerol y optimizamos su cantidad en un primer estudio llevado a cabo en quesos modelo (Publicación 3.1). Como la estrategia resultó ser un éxito en el control de *Clostridium* y prevención de la hinchazón del queso modelo, validamos la misma en queso de tamaño real (Publicación 3.2), incluyendo en la validación el estudio del efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 y de la reuterina sobre las características del queso (Publicaciones 3.3 y 3.4).

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de cuatro publicaciones científicas incluidas en el SCI:

Publicación 3.1. Gómez-Torres N., Ávila M., Gaya P., Garde S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. Food Microbiology 42, 82-88 (revista en el primer decil en la categoría “Food Science & Technology”).

Publicación 3.2. Ávila M.*, Gómez-Torres N.*, Delgado D., Gaya P., Garde S. (2017). Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese. Food Microbiology 66, 104-109, *co-primer autoras (revista en el primer decil en la categoría “Food Science & Technology”).

Publicación 3.3. Garde S.*, Gómez-Torres N.*, Delgado D., Gaya P., Ávila M. (2016). Influence of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on biochemical, physical and sensory properties of semi-hard ewe milk cheese. Food Research International 90, 177-185, *co-primer autoras (revista en el primer cuartil en la categoría “Food Science & Technology”).

Publicación 3.4. Gómez-Torres N., Ávila M., Delgado D., Garde S. (2016). Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. International Journal of Food Microbiology 232, 103-110 (revista en el primer cuartil en la categoría “Food Science & Technology”).



Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct



Natalia Gómez-Torres, Marta Ávila, Pilar Gaya, Sonia Garde*

Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2013
Received in revised form
15 January 2014
Accepted 11 February 2014
Available online 28 February 2014

Keywords:

Clostridium tyrobutyricum
Spore
Cheese blowing
Growth inhibition
Lactobacillus reuteri
Reuterin

ABSTRACT

In this study, reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* INIA P572 was added to cheese as an adjunct culture together with 50 or 100 mM glycerol (required for reuterin production), with the aim of controlling *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 growth and preventing the late blowing defect (LBD) of cheese caused by this strain. *L. reuteri* survived cheese manufacture and produced reuterin *in situ*, detected at 6 and 24 h. However, the produced reuterin was enough to inhibit the growth of *Clostridium*, showing undetectable spore counts from day 30 onward and, therefore, to prevent cheese LBD during ripening (60 d, 14 °C). The acidification of these cheeses was not affected, although from day 14 they showed significantly lower lactococci counts than cheese made only with the starter (control cheese). Cheeses with LBD showed lower levels of lactic acid than control cheese and the formation of propionic and butyric acids, but cheeses with reuterin showed the same organic acids profile than control cheese. The cheese made with *L. reuteri* and 100 mM glycerol showed a light pink colour, not observed in the cheese made with *L. reuteri* and 50 mM glycerol. These results demonstrated a potent anti-clostridial activity of reuterin produced in an actual food product like cheese, and proved to be a novel approach to prevent LBD of cheese.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cheeses are susceptible to spoilage of the final product, resulting in severe economic losses for the cheese industry. The development of defects and alterations depends on the control of those microbiological and technological factors that influence cheese making and ripening such as variations in milk quality, milk pre-treatment (pasteurization), hygiene practices, differences in starter culture activity and acidity profiles, manufacture technology, compositional parameters, and ripening temperature/environments (O'Sullivan et al., 2013). Among them, microbiological factors are the most difficult to control. Undesirable cheese spoilage microorganisms include, among others, coliforms, yeasts, heterofermentative lactic acid bacteria and spore-forming bacteria, which cause early or late blowing defects in cheeses, depending on the microorganism (Ledenbach and Marshall, 2009). Late blowing defect (LBD) appears during the ripening of semi-hard and hard cheeses as *Clostridium* strains, mainly *Clostridium tyrobutyricum*,

carry out the butyric acid fermentation. When lactic acid is metabolized, other organic acids, mainly butyric acid, and gases such as carbon dioxide and hydrogen are produced. The pressure of evolved gases causes cracks and splits, which are generally accompanied by unpleasant aroma and rancid flavour caused by the acids. Although LBD of cheese is an old problem, very well known by cheese manufacturers, eradicate it is a difficult issue since *Clostridium* spores are ubiquitous, much more resistant to heat, chemicals, irradiation and desiccation than vegetative cells, and as few as 50–1000 spores per litre of milk is enough to induce the defect if cheese conditions are suitable for the germination and growth of *Clostridium* (Garde et al., 2013).

The control of *Clostridium* development in cheese has been traditionally done by addition of nitrate or lysozyme, bacteriophage and microfiltration (Lodi, 1990; Stadhouders, 1990; van den Berg et al., 2004), but the application of new anti-clostridial cultures is very promising, especially for the cheese industry. The inoculation of milk with bacteriocinogenic lactic acid bacteria in cheese manufacture has been successfully investigated to prevent LBD (Bogovic Matijasic et al., 2007; Garde et al., 2011b; Martínez-Cuesta et al., 2010; Rilla et al., 2003). Furthermore, in a previous work, the antimicrobial compound reuterin present in a cell-free supernatant

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3474037; fax: +34 91 3572293.
E-mail address: sgarde@inia.es (S. Garde).



Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese



Marta Ávila ^{a,1}, Natalia Gómez-Torres ^{a,1}, David Delgado ^b, Pilar Gaya ^a, Sonia Garde ^{a,*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Estación Tecnológica de la Leche, Carretera de Autilla s/n, 34071 Palencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2017

Received in revised form

6 April 2017

Accepted 13 April 2017

Available online 21 April 2017

Keywords:

Lactobacillus reuteri

Clostridium tyrobutyricum

Reuterin

Cheese

Late blowing

ABSTRACT

The suitability of the biopreservation system formed by reuterin-producing *L. reuteri* INIA P572 and glycerol (required for reuterin production) to prevent late blowing defect (LBD) was evaluated in industrial sized semi-hard ewe milk cheese contaminated with *Clostridium tyrobutyricum* INIA 68, a wild strain isolated from a LBD cheese. For this purpose, six batches of cheese were made (three with and three without clostridial spores): control cheeses with lactococci starter, cheeses with *L. reuteri* as adjunct, and cheeses with *L. reuteri* and 30 mM glycerol. Spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 germinated during pressing of cheese curd, causing butyric acid fermentation in cheese after 30 d of ripening. The addition of *L. reuteri*, without glycerol, enhanced the symptoms and the formation of volatile compounds associated with LBD. When glycerol was added to cheese milk contaminated with *C. tyrobutyricum*, *L. reuteri* was able to produce reuterin in cheese resulting in cheeses with a uniform cheese matrix and a volatile profile similar to cheese made with *L. reuteri* and glycerol (without spores). Accordingly, *L. reuteri* INIA P572 coupled with glycerol seems a novel biopreservation system to inhibit *Clostridium* growth and prevent LBD by means of *in situ* reuterin production.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microbiological spoilage is the prevailing cause of dairy product deterioration, adversely affecting the quality, shelf-life and acceptability of food products and making them unacceptable to the consumer from a sensory point of view and contributing to food wastage. Blowing is the most serious microbial spoilage occurring in cheese because i) a great variety of cheeses can be affected; ii) once the defect emerges in cheese it is impossible to correct, iii) it has a high frequency of occurrence and iv) it has an important economic impact, as blowing usually affects large-volume productions (Quiberoni et al., 2008). The butyric acid bacteria, a group of mainly spoilage bacteria belonging to the spore forming genus *Clostridium*, such as *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* and *Clostridium beijerinckii*, have been associated with late

blowing defect (LBD) in semi-hard and hard cheeses as a consequence of the fermentation of lactate to acetate, butyrate, carbon dioxide and hydrogen gas (Garde et al., 2013), resulting in the appearance of texture and flavour defects in cheese. *Clostridium sporogenes* can also produce gas due to proteolysis in the anaerobic cheese environment (Garde et al., 2011; Gómez-Torres et al., 2015; Le Bourhis et al., 2007).

LBD persists as a major cause of spoilage despite the preventive measures adopted by farmers and cheese makers, and consequently new control strategies other than the use of additives such as nitrate and white-egg lysozyme and milk bactofugation or microfiltration are necessary at cheese factories (Garde et al., 2013). Alternative strategies to control *Clostridium* and prevent LBD in cheese have been proposed, including the cheese milk inoculation with antimicrobial-producing lactic acid bacteria. Among those antimicrobial compounds, reuterin (3-hydroxypropionaldehyde), produced by some strains of *Lactobacillus reuteri* in the presence of glycerol, show activity against a wide range of pathogens and food spoilage organisms (Stevens et al., 2010). Direct addition of reuterin to milk proved to be effective to inhibit the growth of spores and

* Corresponding author.

E-mail address: sgarde@inia.es (S. Garde).

¹ These authors contributed equally to this work.



Influence of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on biochemical, physical and sensory properties of semi-hard ewe milk cheese

Sonia Garde^{a,1}, Natalia Gómez-Torres^{a,1}, David Delgado^b, Pilar Gaya^a, Marta Ávila^{a,*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Estación Tecnológica de la Leche, Carretera de Autilla s/n, 34071 Palencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2016

Received in revised form 28 October 2016

Accepted 29 October 2016

Available online 31 October 2016

Keywords:

Lactobacillus reuteri

Reuterin

Cheese

Proteolysis

Texture

Taste

Ripening

ABSTRACT

The biochemical, physical and sensory characteristics of ewe milk cheeses made with reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* and glycerol (substrate for reuterin production) were assessed. Cheese made with lactococci starter (CTRL), cheese made with starter and *L. reuteri* (SLR), and cheese made with starter, *L. reuteri* and 30 mM glycerol (SLR-G) were manufactured. *L. reuteri* reached counts above 7 log cfu/g on day 1. Lactococci survival was enhanced in SLR cheese without affecting cheese pH, dry matter, proteolysis, concentration of most free amino acids (FAA), textural and most color parameters, or sensory characteristics. *In situ* production of reuterin by *L. reuteri* was only detected in SLR-G cheese, decreasing LAB counts although acidification remained unaffected. SLR-G cheese showed higher values of cell free aminopeptidase activity, overall proteolysis and FAA, particularly glutamic acid, than CTRL and SLR cheeses. The addition of *L. reuteri*-glycerol resulted in lower hardness and elasticity values in SLR-G cheese and influenced its *L**, *a** and *b** color parameters. However, these changes, which were detected by instrumental analysis, did not affect the sensory scores for texture and color quality of SLR-G cheese, and it received the highest scores for taste quality. Our results suggest that *L. reuteri*-glycerol may provide a suitable system to release the antimicrobial reuterin in cheese without affecting negatively its sensory characteristics.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Current social and consumer trends on food safety and quality, health and sustainability are steering the food industry towards the development of safe nutritious foods as well as natural and environmentally friendly technologies, highlighting at the same time the issue of food waste. It has been estimated that as much as 30% of all worldwide grown food may be lost or wasted either before or after it reaches the consumer (The Government Office for Science, 2011). Microbiological spoilage is a significant problem in terms of the shelf life and acceptability of raw and processed foods, and it is a key contributor to food wastage. One of the approaches used to prevent the growth of undesired microorganisms in food is the use of live protective cultures, such as GRAS lactic acid bacteria (LAB). This is an especially interesting option for the dairy industry, which traditionally uses additives to control spoilage microorganisms. LAB develop their protective and beneficial potential in or onto the food through different mechanisms: as a result of their metabolic activity, through competitive exclusion, or by *in situ* production of a variety of inhibitory metabolites such as reuterin

(Servin, 2004). Reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) is produced as an intermediate step by some *Lactobacillus reuteri* strains in the conversion of glycerol to 1,3-propanediol (Lüthi-Peng, Schärer, & Puhan, 2002). Reuterin may lead to depletion of free sulfhydryl-groups in small molecules and proteins of bacteria and cause an alteration of the cellular redox status that may cause the cell death (Schaefer et al., 2010; Vollenweider, Evers, Zurbruggen, & Lacroix, 2010). In addition, reuterin is water-soluble, active on a wide range of pH values and resistant to proteolytic and lipolytic enzymes, displaying a broad inhibitory activity against gram-negative and gram-positive bacteria belonging to *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* and *Collinsella* genera (Stevens, Vollenweider, & Lacroix, 2010).

Biopreservation systems formed by reuterin-producing *L. reuteri* strains coupled with glycerol (that is required for reuterin production) in order to produce reuterin *in situ* were first described by Langa et al. (2013) for yogurt and cheese model systems. Angiolillo, Conte, Zambrini, and Del Nobile (2014) applied external sodium alginate coatings containing *L. reuteri* and glycerol to Fior di Latte cheese, resulting in improved microbial quality (*Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*) and sensory characteristics of cheese. Our group has successfully optimized

* Corresponding author.

E-mail address: arribas@inia.es (M. Ávila).

¹ These authors contributed equally to this work.



Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese



Natalia Gómez-Torres^a, Marta Ávila^a, David Delgado^b, Sonia Garde^{a,*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Estación Tecnológica de la Leche, Carretera de Autilla s/n, 34071 Palencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2015

Received in revised form 26 April 2016

Accepted 31 May 2016

Available online 01 June 2016

Keywords:

Lactobacillus reuteri

Reuterin

Cheese

Volatile compounds

Aroma

Odour

ABSTRACT

The effect of the biopreservation system formed by *Lactobacillus reuteri* INIA P572, a reuterin-producing strain, and glycerol (required for reuterin production), on the volatile fraction, aroma and odour of industrial sized semi-hard ewe milk cheese (Castellano type) was investigated over a 3-month ripening period. The volatile compounds were extracted and analyzed by SPME-GC-MS and cheese odour and aroma profiles were studied by descriptive sensory analysis. Control cheese was made only with a mesophilic starter and experimental cheeses with *L. reuteri* were made with and without glycerol. The addition of *L. reuteri* INIA P572 to milk enhanced the formation of six volatile compounds. Despite the changes in the volatile compounds profile, the use of *L. reuteri* INIA P572 did not noticeably affect the sensory characteristics of cheese. On the other hand, the addition of *L. reuteri* INIA P572 coupled with 30 mM glycerol enhanced the formation of twelve volatile compounds, but decreased the formation of five ones. The use of the biopreservation system did not affect overall odour and aroma quality of cheese although it resulted in a significant decrease of the odour intensity scores. In addition, this cheese received significant higher scores for “cheesy” aroma and significant lower scores for the aroma attributes “milky”, “caramel” and “yogurt-like”. The first two axes of a principal component analysis (PCA) performed for selected volatile compounds and sensory characteristics, accounting for 75% of the variability between cheeses, separated cheeses made with *L. reuteri* INIA P572 and glycerol from the rest of cheeses, and also differentiated control cheese from cheeses made with *L. reuteri* INIA P572 from day 60 onward. Our results showed that the reuterin-producing *L. reuteri* INIA P572 strain, when coupled with glycerol, may be a suitable biopreservation system to use in cheese without affecting odour and aroma quality.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Reuterin is an antimicrobial compound that consists of monomeric, hydrated monomeric, and cyclic dimeric forms of 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA), with a broad spectrum of antimicrobial activity towards a wide range of pathogens and food spoilage organisms including gram-positive and gram-negative bacteria, yeasts and moulds (Vollenweider and Lacroix, 2004). It induces oxidative stress in cells by modifying thiol groups in proteins and small molecules, ultimately resulting in cell death (Schaefer et al., 2010; Vollenweider et al., 2010). Reuterin is water-soluble, active at a wide range of pH values, and resistant to proteolytic and lipolytic enzymes. All these properties make of reuterin a potential food biopreservative. *Lactobacillus reuteri* is the only species that produces high levels of reuterin in the presence of glycerol, while being highly resistant to the antimicrobial activity of reuterin (Schaefer et al., 2010). *L. reuteri* is a heterofermentative lactic acid

bacteria that belongs to the microbiota of humans and animals gut (Vollenweider and Lacroix, 2004). In addition, it has been isolated from a variety of food products including dairy products (Casas and Dobrogosz, 2000), and it is used as a probiotic in the health care of humans and animals (Vollenweider and Lacroix, 2004).

Application of reuterin as an alternative strategy for decontamination and preservation of dairy products has been described. Direct addition of reuterin as an additive to prevent the growth of pathogenic microorganisms in milk and dairy products has been proposed (Arqués et al., 2004, 2008a, 2008b, 2011; El-Ziney and Debevere, 1998), but to date reuterin is not legislated as a food preservative. To overcome this limitation, biopreservation systems consisting of a reuterin-producing *L. reuteri* strain and glycerol (registered in the European Union as food additive E 422) have been recently proposed for dairy products (Angiolillo et al., 2014; Gómez-Torres et al., 2014; Langa et al., 2013). Langa et al. (2013) successfully proved the *in situ* production of reuterin by *L. reuteri* plus glycerol in yogurt and cheese model systems. The application of an active coating enriched with *L. reuteri* and glycerol to Fior di Latte cheese prolonged its microbial quality and, thus, its shelf life (Angiolillo et al., 2014). Late blowing defect of cheese caused by

* Corresponding author.

E-mail address: sgarde@inia.es (S. Garde).

Empleo de *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, productor de nisina, como fermento en la elaboración de queso para el control de *C. tyrobutyricum* y la prevención de hinchazón tardía

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de quesos modelo

Los quesos modelo se elaboraron en el laboratorio siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 de esta tesis. En esta ocasión se partió de leche pasteurizada de vaca que se distribuyó en cuatro cubas. Las cubas 1 y 3 se inocularon con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2, mutante de *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 no productor de bacteriocina, y las cubas 2 y 4 con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, productor de nisina. Además, las cubas 3 y 4 se inocularon con $1,2 \times 10^3$ esporas/ml de *C. tyrobutyricum* CECT 4011.

Análisis microbiológicos en queso

La toma de muestras, diluciones, recuentos de bacterias lácticas y esporas se llevó a cabo según lo descrito en el Capítulo 1 de esta Tesis.

La actividad de la nisina en queso se determinó por duplicado mediante un ensayo de difusión en agar. Se partió de 5 g de queso que se homogeneizaron en un Stomacher con 10 ml de HCl 0,02 N estéril y precalentado a 50 °C. El homogeneizado se centrifugó a 12000 *g* durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se esterilizó por filtración y se ajustó el pH a 6 con NaOH 1 N estéril. Se depositaron 50 µl del sobrenadante neutralizado en pocillos de 5 mm de diámetro, realizados con un sacabocados estéril, sobre placas de 50 ml de MRS agar inoculadas al 0,1% con *Lactobacillus buchneri* St2A como microorganismo indicador. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. La actividad de la nisina se expresó como diámetro (mm) de la zona de inhibición del crecimiento.

Análisis físico-químicos en queso

El pH y el extracto seco se determinaron según lo descrito en el Capítulo 1 de esta tesis, y los ácidos orgánicos según lo descrito en el Capítulo 3.

Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó según lo descrito en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bacterias lácticas y producción de bacteriocina

El recuento de bacterias lácticas corresponde a los recuentos de las cepas de *L. lactis* subesp. *lactis* empleadas como fermentos en la elaboración de los quesos modelo. Los recuentos de lactococos se mantuvieron constantes durante los 21 días de maduración y no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,01$) entre los quesos a lo largo de la maduración (Tabla A3.1). Sin embargo, solo se detectó actividad bacteriocina en los quesos elaborados con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, productor de nisina. Resultados similares fueron obtenidos por Garde y col. (2011b) en quesos modelo elaborados con leche de oveja y empleando estas cepas como fermentos.

Tabla A3.1. Recuento¹ de bacterias lácticas y actividad bacteriocina² en los quesos modelo elaborados con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2 (mutante no productor de nisina, NPN), *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 (productor de nisina, PN) y esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011

	Tiempo (días)	Sin <i>C. tyrobutyricum</i>		Con <i>C. tyrobutyricum</i>	
		NPN	PN	NPN	PN
Bacterias lácticas	1	9,55 ± 0,10a	9,55 ± 0,08a	9,56 ± 0,13a	9,51 ± 0,11a
	14	9,59 ± 0,11a	9,65 ± 0,10a	9,68 ± 0,07a	9,63 ± 0,14a
	21	9,63 ± 0,11a	9,61 ± 0,14a	9,64 ± 0,08a	9,66 ± 0,15a
Actividad nisina	1	NDa	26,63 ± 0,48b	NDa	26,13 ± 0,90b
	14	NDa	21,75 ± 0,65b	NDa	21,75 ± 0,96b
	21	NDa	16,50 ± 0,41b	NDa	16,38 ± 0,75b

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como log ufc/g de queso. ² Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como diámetro (mm) de la zona de inhibición del crecimiento. Medias con distinta letra en la misma fila difieren significativamente ($P < 0,01$). ND: no detectado.

Esporas de *Clostridium* y aparición de hinchazón tardía

Solo se detectaron esporas en los quesos contaminados artificialmente con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 (Tabla A3.2). En estos quesos, los recuentos de esporas a las 24 h fueron una media de 9 veces mayores que en la leche como consecuencia de su concentración en la cuajada.

Tabla A3.2. Recuento¹ de esporas y síntomas de hinchazón en los quesos modelo elaborados con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2 (mutante no productor de nisina, NPN), *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 (productor de nisina, PN) y esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011

	Tiempo (días)	Sin <i>C. tyrobutyricum</i>		Con <i>C. tyrobutyricum</i>	
		NPN	PN	NPN	PN
Esporas	1	NDa	NDa	3,98 ± 0,14b	4,10 ± 0,18b
	14	NDa	NDa	2,09 ± 0,07b	3,46 ± 0,08c
	21	NDa	NDa	2,46 ± 0,10c	1,27 ± 0,09b
Hinchazón	1	No	No	No	No
	14	No	No	Si	No
	21	No	No	Si	Si

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como log ufc/g de queso. Medias con distinta letra en la misma fila difieren significativamente ($P < 0,01$). ND: no detectado ($< 0,40$ log ufc/g de queso).

Los quesos se inspeccionaron periódicamente a lo largo de la maduración para determinar la aparición de la hinchazón tardía. Los quesos con hinchazón se identificaron por la formación de gas en la bolsa de envasado, la aparición de cavidades o rajaduras en el interior del queso, en algunos casos incluso abultamientos externos, y/o la detección de olor a ácido butírico al abrir la bolsa de envasado o cortar el queso. Solo los quesos inoculados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 presentaron hinchazón. El queso elaborado con esporas y con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2 mostró hinchazón a los 14 días, coincidiendo con un descenso en el recuento de esporas como consecuencia de la germinación (Tabla A3.2). En el caso del queso elaborado con esporas y el productor de bacteriocina, la aparición de hinchazón solo se retrasó una semana pese a la detección de actividad nisina durante toda la maduración. En este momento, a los 21 días, el recuento de esporas en este queso también descendió como consecuencia de la germinación, mientras que el recuento de esporas aumentó en el queso elaborado con el mutante, no productor de nisina, como consecuencia de la esporulación. A diferencia de nuestros resultados, *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 fue capaz de controlar el crecimiento de *C. beijerinckii* INIA 63 y prevenir la hinchazón tardía causada por éste en quesos modelo artificialmente contaminados con esporas de ese microorganismo durante 120 días de maduración (Garde y col. 2011b). Por otra parte, el empleo de *L. lactis* subesp. *lactis* IPLA 729,

productor de nisina, como fermento consiguió controlar el crecimiento de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y prevenir la hinchazón tardía en queso Vidiago (Rilla y col. 2003). El empleo de *L. lactis* IFPL 3593, productor de lacticina 3147, como adjunto en la elaboración de queso, previno la aparición de hinchazón tardía en queso semiduro inoculado con esporas de *Clostridium* (Martínez-Cuesta y col. 2010). En cambio, el empleo del productor de bacteriocinas *Lactobacillus gasseri* K7 como adjunto en la elaboración de queso, solo retrasó el desarrollo de *C. tyrobutyricum* y la aparición de hinchazón (Bogovic-Matijasic y col. 2007). *Lactobacillus plantarum* TF711, productor de plantaricina TF711, tampoco previno la hinchazón causada por *C. sporogenes*, cuando se utilizó como adjunto en la elaboración de queso (González y Zárate 2015).

Valores de pH y extracto seco

No se apreciaron diferencias significativas de pH entre los quesos de 1 día, que mostraron un valor medio de 5,00 (Tabla A3.3). En los quesos con hinchazón el pH aumentó como consecuencia de la desacidificación debida a la actividad metabólica de *Clostridium* (Bogovic-Matijasic y col. 2007; Le Bourhis y col. 2007). En los quesos sin hinchazón, los valores de pH se mantuvieron constantes durante los 21 días de maduración.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,01$) entre los quesos para el extracto seco a lo largo de la maduración (Tabla A3.3). El extracto seco se mantuvo en valores muy similares durante los 21 días de maduración.

Ácidos orgánicos

En los quesos que no desarrollaron hinchazón tardía, la concentración de ácido láctico se mantuvo prácticamente constante durante la maduración, y no se detectó la presencia ni de ácido propiónico ni de ácido butírico en ninguno de ellos (Tabla A3.4). En cambio, en los quesos con hinchazón tardía, y como consecuencia de la fermentación butírica llevada a cabo por *C. tyrobutyricum* CECT 4011, se observó un descenso del contenido de ácido láctico durante la maduración, así como la formación de ácidos propiónico y butírico coincidiendo con la aparición de síntomas de hinchazón en cada queso. El mayor consumo de ácido láctico y formación de ácidos propiónico y butírico se observó al final de la maduración en el queso

elaborado con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2, que fue el primero en desarrollar hinchazón (Tabla A3.2).

Tabla A3.3. Valores de pH¹ y extracto seco² de los quesos modelo elaborados con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2 (mutante no productor de nisina, NPN), *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 (productor de nisina, PN) y esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011

	Tiempo (días)	Sin <i>C. tyrobutyricum</i>		Con <i>C. tyrobutyricum</i>	
		NPN	PN	NPN	PN
pH	1	4,99 ± 0,09a	5,00 ± 0,11a	5,01 ± 0,08a	5,01 ± 0,07a
	14	5,05 ± 0,08a	5,03 ± 0,07a	5,41 ± 0,06b	5,04 ± 0,05a
	21	5,03 ± 0,10a	5,02 ± 0,11a	5,57 ± 0,09c	5,29 ± 0,06b
Extracto seco	1	55,21 ± 0,34a	55,91 ± 0,79a	55,71 ± 1,15a	55,76 ± 0,94a
	14	55,35 ± 1,24a	55,92 ± 1,40a	55,58 ± 1,53a	55,50 ± 1,14a
	21	56,65 ± 2,09a	56,14 ± 1,26a	56,75 ± 1,18a	56,40 ± 0,54a

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones. ² Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como %. Medias con distinta letra en la misma fila difieren significativamente ($P < 0,01$).

En otros quesos con hinchazón tardía elaborados con leche contaminada artificialmente con esporas de *Clostridium* también se registraron menores niveles de ácido láctico, y mayores niveles de ácidos propiónico y butírico (Bogovic-Matijasic y col. 2007; Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2011b). Estos autores atribuyeron estos cambios a la actividad metabólica de *Clostridium*. Por otra parte, Garde y col. (2012a) recogieron quesos Manchego con hinchazón tardía y observaron que la concentración de ácido butírico aumentaba y que la concentración de ácido láctico disminuía con el grado de hinchazón. También observaron un aumento de ácido propiónico en los quesos hinchados y elaborados con leche pasteurizada.

Tabla A3.4. Concentración¹ de ácidos láctico, propiónico y butírico en los quesos modelo elaborados con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415-2 (mutante no productor de nisina, NPN), *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 (productor de nisina, PN) y esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011

	Tiempo (días)	Sin <i>C. tyrobutyricum</i>		Con <i>C. tyrobutyricum</i>	
		NPN	PN	NPN	PN
Ácido láctico	1	26,94 ± 0,74a	26,29 ± 0,96a	26,55 ± 1,10a	26,63 ± 1,05a
	14	26,48 ± 0,71b	25,62 ± 0,95b	19,71 ± 1,36a	26,38 ± 1,75b
	21	26,20 ± 1,19c	25,46 ± 1,28c	16,95 ± 0,74a	20,67 ± 0,45b
Ácido propiónico	1	NDa	NDa	NDa	NDa
	14	NDa	NDa	1,29 ± 0,06b	NDa
	21	NDa	NDa	1,91 ± 0,12c	0,89 ± 0,07b
Ácido butírico	1	NDa	NDa	NDa	NDa
	14	NDa	NDa	1,90 ± 0,11b	NDa
	21	NDa	NDa	2,78 ± 0,16c	1,20 ± 0,08b

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como mg/g de extracto seco de queso. Medias con distinta letra en la misma fila difieren significativamente ($P < 0,01$). ND: no detectado.

BIBLIOGRAFÍA

- Bogovic-Matijasic B, Rajsp MK, Perko B, Rogelj I (2007) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal* 17: 157-166.
- Garde S, Arias R, Gaya P, Nuñez M (2011a) Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego Cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal* 21: 271-278.
- Garde S, Ávila M, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2011b) Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150: 59-65.
- Garde S, Ávila M, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2012a) Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal* 25: 87-91.
- González L, Zárate V (2015) Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture. *Journal of Dairy Research* 82: 236-241
- Le Bourhis AG, Dore J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL (2007) Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology* 113: 154-163.
- Martínez-Cuesta MC, Bengoechea J, Bustos I, Rodríguez B, Requena T, Pelaez C (2010) Control of late blowing in cheese by adding lactacin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal* 20: 18-24.
- Rilla N, Martínez B, Delgado T, Rodríguez A (2003) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology* 85: 23-33.

Capítulo 4

Control de *C. tyrobutyricum* y prevención de hinchazón tardía en queso mediante la aplicación de altas presiones

Prefacio

La tecnología de altas presiones es probablemente el método de conservación de alimentos alternativo a los tradicionales tratamientos térmicos que está más desarrollado comercialmente, ya que permite la inactivación de microorganismos indeseables con bajo impacto en la calidad nutritiva y sensorial del producto. Sin embargo, la inactivación de esporas mediante altas presiones es un gran desafío debido a la gran resistencia que éstas presentan. No obstante, la aplicación de tratamientos cíclicos combinando un ciclo de germinación y un ciclo de inactivación podría ser efectiva en el control de *Clostridium* y prevención de la hinchazón tardía del queso. Por ello, dentro del Objetivo 5 realizamos un estudio previo utilizando cuñas de queso como sistema modelo y tratamientos cíclicos de alta presión combinando un ciclo de germinación y uno de inactivación. Este trabajo no ha sido publicado, pero hemos considerado imprescindible incluirlo como un apéndice del Capítulo 4 para entender el desarrollo de la presente Tesis. Como podemos ver en el apéndice del Capítulo 4, la aplicación de altas presiones controló el desarrollo de *Clostridium* y previno la hinchazón del queso. Por ello, procedimos a la validación de esta tecnología de conservación en queso de tamaño real, incluyendo en la validación el estudio del efecto de los tratamientos de alta presión sobre las características del queso.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones científicas incluidas en el SCI:

Publicación 4.1. Ávila M., Gómez-Torres N., Delgado D., Gaya P., Garde S. (2016). Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese. Food Microbiology 60, 165-173 (revista en el primer decil en la categoría “Food Science & Technology”).

Publicación 4.2. Ávila M., Gómez-Torres N., Delgado D., Gaya P., Garde S. (2017). Effect of high-pressure treatments on proteolysis, volatile compounds, texture, colour, and sensory characteristics of semi-hard raw ewe milk cheese. Food Research International 100, 595-602 (revista en el primer cuartil en la categoría “Food Science & Technology”).



Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese



Marta Ávila^a, Natalia Gómez-Torres^a, David Delgado^b, Pilar Gaya^a, Sonia Garde^{a,*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Estación Tecnológica de la Leche, Carretera de Autilla s/n, 34071 Palencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2016

Received in revised form

10 June 2016

Accepted 10 July 2016

Available online 30 July 2016

Keywords:

High pressure

Clostridium tyrobutyricum

Cheese

Spoilage

Late blowing defect

ABSTRACT

In this study we evaluated the application of different high pressure (HP) treatments (200–500 MPa at 14 °C for 10 min) to industrial sized semi-hard cheeses on day 7, with the aim of controlling two *Clostridium tyrobutyricum* strains causing butyric acid fermentation and cheese late blowing defect (LBD). *Clostridium* metabolism and LBD appearance in cheeses were monitored by sensory (cheese swelling, cracks/splits, off-odours) and instrumental analyses (organic acids by HPLC and volatile compounds by SPME/GC–MS) after 60 days. Cheeses with clostridial spores HP-untreated and HP-treated at 200 MPa showed visible LBD symptoms, lower concentrations of lactic, citric and acetic acids, and higher levels of pyruvic, propionic and butyric acids and of 1-butanol, ethyl and methyl butanoate, and ethyl pentanoate than cheeses without spores. However, cheeses with clostridial spores and HP-treated at ≥ 300 MPa did not show LBD symptoms and their organic acids and volatile compounds profiles were comparable to those of their respective HP-treated control cheeses, despite HP treatments caused a low spore reduction. A decrease in *C. tyrobutyricum* spore counts was observed after curd pressing, which seems to indicate an early spore germination, suggesting that HP treatments ≥ 300 MPa were able to inactivate the emerged *C. tyrobutyricum* vegetative cells and, thereby, prevent LBD.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Food spoilage members of *Clostridiales* form endospores, highly resistant structures capable of persisting in the environment for an extended time, which may largely exceed many years (Gould, 2006; Kennedy et al., 1994). They are of particular concern in vacuum-packed meat products, causing the typically recognized as “blown pack” spoilage, and in dairy products, causing the “late blowing defect” (LBD) of cheeses, with major financial consequences for the food industry. The butyric acid bacteria, a group of mainly spoilage bacteria such as *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* and *Clostridium beijerinckii*, have been associated with LBD in semi-hard and hard cheeses, particularly prone to experience this kind of spoilage due to their long ripening periods (Garde et al., 2013). The germination machinery of dormant butyric acid bacteria spores may be activated during cheese manufacture and ripening, giving rise to metabolically active vegetative cells, which are able to grow

in the cheese. These vegetative cells are able to metabolise cheese lactate to acetate, butyrate, carbon dioxide and hydrogen gas (Bassi et al., 2015; Cocolin et al., 2004; Garde et al., 2011a; Gómez-Torres et al., 2015; Klijn et al., 1995; Le Bourhis et al., 2005, 2007; Nishihara et al., 2014; Zucali et al., 2015) resulting in cheese swelling, rancid off-flavours and in cracks and slits in the paste, characteristic of LBD. Also, *Clostridium sporogenes* can produce gas due to proteolysis in the anaerobic cheese environment (Garde et al., 2011a; Gómez-Torres et al., 2015; Goudkov and Sharpe, 1965; Le Bourhis et al., 2007).

New processing technologies may be an aid to inhibit spoilage clostridia in cheese. High pressure (HP) processing, probably the most commercially developed emerging technology today, allows the inactivation of pathogenic and spoilage food-borne microorganisms and the extension of food shelf-life with low impact on its nutritional and sensory characteristics (Balasubramaniam et al., 2015). In the last years, this non-thermal technology has been used on milk and dairy products, including cheeses, with different inactivation effectiveness depending on microbial characteristics, process conditions, and product parameters (Trujillo et al., 2002; Martínez-Rodríguez et al., 2012). However, the inactivation of

* Corresponding author.

E-mail address: sgarde@inia.es (S. Garde).



Effect of high-pressure treatments on proteolysis, volatile compounds, texture, colour, and sensory characteristics of semi-hard raw ewe milk cheese



Marta Ávila^a, Natalia Gómez-Torres^a, David Delgado^b, Pilar Gaya^a, Sonia Garde^{a,*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Estación Tecnológica de la Leche, Carretera de Autilla s/n, 34071 Palencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

High pressure
Ewe milk cheese
Proteolysis, texture, volatile compounds
Sensory characteristics

ABSTRACT

High pressure (HP) offers potential industrial applications in cheese preservation, but it is essential to provide knowledge concerning their effects on the ripening process and sensory characteristics. In this study, we investigated the effect of different HP treatments (200–500 MPa at 14 °C for 10 min on day 7) on proteolysis, texture, colour, volatile compounds and sensory characteristics of semi-hard raw ewe milk cheese. HP treatments did not affect pH or dry matter values of 60-day-old cheeses. Treatments at pressure levels up to 400 MPa led to significant ($P < 0.01$) increases in the total free amino acids (FAA) content at 60 days, compared to control cheese, although the cell-free aminopeptidase activity was lower. HP retarded the formation of some volatile compounds in cheeses, the number of compounds affected by HP being higher as the pressure level increased. Cheeses pressurized at 300–500 MPa had lower levels of 2-butanone, 2-butanol, 2-propen-1-ol, 1-butanol and acetic acid than control cheese, cheeses pressurized at 400–500 MPa lower levels of 1-propanol, 2-pentanol, and butyric and hexanoic acids, and cheeses pressurized at 500 MPa lower levels of ethanol, 3-methyl-1-butanol and 3-methyl-2-buten-1-ol. All HP-treated cheeses showed higher fracturability values, and higher Hue angle and lower a^* values than control cheese. Despite the differences detected by instrumental analyses between HP-cheeses and control cheese, few significant differences were found between the sensory characteristics of HP-cheeses and control cheese. Only the pressurization of cheese at 500 MPa affected significantly ($P < 0.01$) some of the sensory characteristics, with a negative effect on taste intensity but a positive effect on aroma quality.

In summary, HP treatments at 200 and 300 MPa showed the mildest effects on the characteristics of semi-hard raw ewe milk cheese. HP treatment of this cheese variety at 300, 400 and 500 MPa prevented late blowing defect caused by *Clostridium tyrobutyricum* (Ávila et al., 2016, Food Microbiol. 60, 165–173). Thus, it may be concluded that HP treatment at 300 MPa is the most adequate procedure, able to prevent late blowing with minimum changes in cheese characteristics.

1. Introduction

High-pressure (HP) treatment is a non-thermal method to eliminate undesirable microorganisms in foods, ensuring their microbiological safety and extending their shelf life, with low impact on its nutritional and sensory characteristics. Most HP applications for cheese are related to the inactivation or reduction of pathogenic and spoilage microorganisms (Martínez-Rodríguez et al., 2012). In addition, several works have studied the application of HP treatments to accelerate cheese ripening (Martínez-Rodríguez et al., 2012), as well as to prevent over-ripening (Calzada, del Olmo, Picón, Gaya, & Nuñez, 2013a,b, 2014a,b). However, to date most HP-related cheese studies involved the use of

cow milk, existing very limited information for ewe milk cheeses.

Regarding cheeses made from pasteurized ewe milk, HP treatment of a semi-hard cheese at 300 MPa on day 1 accelerated cheese proteolysis, but the treatment at 500 MPa decelerated it (Juan, Ferragut, Buffa, Guamis, & Trujillo, 2007). In the same type of cheese, the application of HP limited the formation of some volatile compounds, including acids, alcohols, ketones, aldehydes, and sulfur compounds (Juan, Barron, Ferragut, & Trujillo, 2007). In addition, treatments at 200 and 300 MPa enhanced the firmness of cheeses but pressurization at 500 MPa produced a weakening effect in the casein matrix (Juan, Trujillo, Guamis, Buffa, & Ferragut, 2007). In contrast, pressurization of ovine brined cheese at 200 MPa on day 15 did not affect cheese

* Corresponding author.

E-mail address: sgarde@inia.es (S. Garde).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.043>

Received 7 April 2017; Received in revised form 7 July 2017; Accepted 13 July 2017

Available online 26 July 2017

0963-9969/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Control de *C. tyrobutyricum* y prevención de hinchazón tardía en un sistema modelo de queso mediante la aplicación de altas presiones

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema modelo de queso

Se utilizaron cuñas de queso como sistema modelo para realizar los estudios previos de prevención de hinchazón tardía mediante la aplicación de altas presiones. Se partió de leche pasteurizada de oveja que se distribuyó en dos cubas. Ambas cubas fueron inoculadas con el fermento comercial mesófilo Choozit™ MA 11. Además, la cuba 2 se inoculó con 10^5 esporas/ml de *C. tyrobutyricum* INIA 68. Los quesos se elaboraron según el procedimiento descrito para el queso Castellano en el Capítulo 3 de esta Tesis. De cada cuba se obtuvieron dos quesos de aproximadamente 1 kg. A las 24 h, cada queso se fraccionó en 7 cuñas de aproximadamente 140 g (14 cuñas por cuba). Una de las cuñas se utilizó para llevar a cabo los análisis de 24 h. Otra se descartó, ya que de ella se había tomado muestra para los análisis de 6 h, y las 12 restantes se envasaron al vacío y maduraron a 14 °C hasta la aplicación de los tratamientos de alta presión a los 7 días. Tras el tratamiento, la mitad de las muestras se utilizaron para llevar a cabo los análisis de 7 días y la otra mitad se volvieron a madurar y se analizaron a los 60 días.

Tratamiento de altas presiones

Las cuñas de queso fueron sometidas a los 7 días de maduración a los distintos tratamientos de altas presiones que se recogen en la Tabla A4.1 en un equipo de altas presiones Wave 6000/135 (Hiperbaric S.A., Burgos, España). Se utilizó agua como líquido transmisor de la presión a una temperatura inicial que osciló entre 13,9 y 14,4 °C. La temperatura de los quesos antes del tratamiento fue de 12 °C. Después de los tratamientos, los quesos fueron madurados a 14 °C durante 60 días.

Análisis microbiológicos en queso

La toma de muestras, diluciones, recuentos de bacterias lácticas y esporas se llevó a cabo según lo descrito en el Capítulo 1 de esta Tesis.

Análisis físico-químicos en queso

El pH, el extracto seco y los ácidos orgánicos se determinaron según lo descrito en el Capítulo 3 de esta Tesis.

Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó según lo descrito en el Capítulo 4 de esta Tesis.

Tabla A4.1. Tratamientos de altas presiones ensayados en cuñas de quesos elaborados con esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011

Tratamiento	Condiciones de altas presiones
A	Sin tratamiento
B	100 MPa, 30 min (germinación)
C	100 MPa, 30 min (germinación) + 400 MPa, 15 min (inactivación)
D	100 MPa, 30 min (germinación) + 3 ciclos de 400 MPa, 5 min (inactivación)
E	400 MPa, 15 min (inactivación)
F	3 ciclos de 400 MPa, 5 min (inactivación)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bacterias lácticas

El recuento de lactococos, correspondiente a las bacterias del fermento, fue similar para las dos cubas a 1 día, y se mantuvo constante hasta los 7 días (Tabla A4.2), momento en el que se aplicaron los tratamientos de altas presiones. La aplicación del ciclo de germinación (100 MPa, 30 min) no tuvo ningún efecto sobre el recuento de lactococos a los 7 días. Sin embargo, todos los tratamientos en los que se aplicaron 400 MPa provocaron una reducción en el nivel de lactococos, con recuentos medios 3,86 log ufc/g inferiores a las de sus respectivas cuñas de queso no presurizadas a los 7 días. En las cuñas de queso no presurizadas, los recuentos de lactococos descendieron una media de 2,70 log ufc/g a los 60 días con respecto al día 1 (Tabla A4.2). El ciclo de germinación no afectó ($P > 0,01$) al recuento de lactococos, mientras que en las cuñas de queso en las que se aplicaron los distintos tratamientos a 400 MPa no se detectó la presencia de estos microorganismos a los 60 días.

Tabla A4.2. Recuento¹ de bacterias lácticas en las cuñas de los quesos elaborados con esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y tratadas por altas presiones

	Tiempo (días)	Altas presiones	Sin esporas	Con esporas
Lactococos	1	----	9,57 ± 0,06	9,62 ± 0,07
	7	Sin tratamiento	9,58 ± 0,07	9,71 ± 0,05
		100 MPa 30 min	9,62 ± 0,09	9,75 ± 0,03
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	6,17 ± 0,53*	5,85 ± 0,16*
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	5,73 ± 0,38*	5,69 ± 0,40*
		400 MPa 15 min	5,67 ± 0,14*	5,87 ± 0,64*
		3 x 400 MPa 5 min	5,71 ± 0,19*	5,59 ± 0,39*
	60	Sin tratamiento	7,21 ± 0,21	6,76 ± 0,49*
		100 MPa 30 min	7,15 ± 0,29	6,82 ± 0,36*
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	ND	ND
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	ND	ND
		400 MPa 15 min	ND	ND
		3 x 400 MPa 5 min	ND	ND
Lactobacilos	1	----	ND	ND
	7	Sin tratamiento	ND	ND
		100 MPa 30 min	ND	ND
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	ND	ND
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	ND	ND
		400 MPa 15 min	ND	ND
		3 x 400 MPa 5 min	ND	ND
	60	Sin tratamiento	7,12 ± 0,12	5,28 ± 0,20*
		100 MPa 30 min	7,23 ± 0,39	5,19 ± 0,78*
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	8,24 ± 0,18*	7,99 ± 0,18*
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	8,01 ± 0,33*	8,00 ± 0,24*
		400 MPa 15 min	8,19 ± 0,17*	8,17 ± 0,19*
		3 x 400 MPa 5 min	8,33 ± 0,10*	8,15 ± 0,11*

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como log ufc/g de queso. * En la columna, indica que la media difiere ($P < 0,01$, test de Dunnett) de la de su respectiva cuña de queso no tratada por altas presiones a cada tiempo de maduración. * En la fila, indica que la media difiere ($P < 0,01$, DMS) de la de su respectiva cuña de queso sin esporas. ND, no detectado ($< 1,40$ log ufc/g de queso).

La reducción en los recuentos de lactococos por la aplicación de altas presiones a 400 MPa ha sido descrita en distintas variedades de queso. En quesos Cheddar elaborados con 4 cepas de *L. lactis* individualmente, la aplicación de 400 MPa (20 min, 25 °C) a 1 día redujo su recuento entre 2 y 5 log ufc/g dependiendo de la cepa, y no se detectó la presencia de dos de las cepas a los 30 días de maduración (O'Reilly y col. 2002). La aplicación de esta misma presión (10 min, 12 °C) en queso semicurado de oveja a 1 o 15 días de maduración redujo los recuentos de lactococos 1,67 y 2,02 log ufc/g, respectivamente, a los 60 días (Juan y col. 2007b). Sin embargo, los recuentos de lactococos en estos quesos fueron similares a los del queso no presurizado a los 60 días. En queso de La Serena, la aplicación de altas presiones a 400 MPa a los 2 días (10 min, 14 °C) provocó una reducción del recuento de lactococos de 1,96 log ufc/g, siendo el recuento del queso presurizado 0,71 log ufc/g inferior al del queso no tratado a los 60 días (Arqués y col. 2006).

La presencia de lactobacilos no se detectó hasta los 60 días, siendo el recuento de 7,12 log ufc/g en la cuña no presurizada del queso elaborado sin esporas (Tabla A4.2). El ciclo de germinación (100 MPa, 30 min) no tuvo ningún efecto sobre el recuento de lactobacilos. Sin embargo, y al contrario que sucedió con los recuentos de lactococos, las cuñas presurizadas a 400 MPa mostraron unos recuentos de lactobacilos medios 1,08 y 2,80 log ufc/g superiores a los de las cuñas no presurizadas de los quesos elaborados sin y con esporas, respectivamente. La mayor resistencia de *Lactobacillus* comparado con *Lactococcus* a las altas presiones (Casal y Gómez 1999) podría explicar nuestros resultados. Por otra parte, los menores niveles de lactococos en los quesos presurizados a 400 MPa suponen una menor competencia para los lactobacilos, lo que podría haber facilitado su desarrollo en el queso. Juan y col. (2007b) también describieron mayores niveles de lactobacilos a los 60 días en los quesos tratados a 400 MPa a 1 día que en el queso no presurizado.

Por otra parte, la cuña no presurizada y la presurizada a 100 MPa del queso elaborado con esporas de *Clostridium* (que como veremos en el siguiente apartado, fueron las únicas que presentaron hinchazón tardía) mostraron niveles de lactococos y lactobacilos significativamente ($P < 0,01$) inferiores a las de sus respectivas cuñas del queso elaborado sin esporas a los 60 días (Tabla A4.2). Este resultado parece indicar que algunos de los compuestos producidos durante el metabolismo de *Clostridium* en el queso podrían haber afectado negativamente a la

supervivencia de los lactococos del fermento y al desarrollo de los lactobacilos pertenecientes a la microbiota secundaria del queso.

Esporas de *Clostridium* y aparición de hinchazón tardía

Solo se detectó la presencia de esporas en las cuñas del queso artificialmente contaminado con *C. tyrobutyricum* INIA 68 (Tabla A4.3). En la cuajada de este queso, el recuento de esporas fue 5,13 veces mayor que en la leche como consecuencia de su concentración tras el desuerado. Después de 4 h de prensado (queso de 6 h), el recuento de esporas descendió 2,58 log ufc/g, indicando una temprana germinación de las esporas a células vegetativas. El nivel de esporas fue similar a las 24 h, descendió 0,5 log ufc/g a los 7 días y se mantuvo constante a los 60 días en la cuña no presurizada, sugiriendo una baja o nula tasa de esporulación en el queso por parte de este microorganismo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el Capítulo 3 de la presente Tesis Doctoral en los quesos de tamaño real elaborados con *C. tyrobutyricum* INIA 68. A los 7 días, las cuñas de queso presurizadas mostraron unos recuentos de esporas similares a la cuña no tratada, excepto la cuña tratada a 100 MPa durante 30 min seguida de tratamiento a 400 MPa durante 15 min, que mostró un recuento significativamente ($P < 0,01$) inferior. A los 60 días, la cuña tratada con el ciclo de germinación mostró un nivel de esporas similar al de la cuña no presurizada. Sin embargo, las cuñas tratadas a 400 MPa mostraron un recuento medio 0,73 log ufc/g inferior al de la cuña no presurizada.

El ciclo de germinación no aumentó la tasa de germinación de las esporas de *C. tyrobutyricum* que no habían germinado durante el prensado del queso, por lo que su aplicación en combinación con los tratamientos de inactivación no supuso ninguna ventaja en la inactivación de las mismas con respecto a la aplicación de solo los ciclos de inactivación.

La aplicación de los tres ciclos a 400 MPa tampoco supuso ninguna ventaja frente al tratamiento simple en la inactivación de esporas. Por otra parte, la reducción de esporas debida a la aplicación de los tratamientos a 400 MPa fue baja. En nuestro estudio, es posible que las esporas de *C. tyrobutyricum* que no germinaron durante el prensado del queso fueran más resistentes a la germinación inducida por las altas presiones, y por tanto también a su inactivación. Gould y Sale (1970) observaron que las esporas de *Bacillus* que no germinaban bajo la acción de germinantes tampoco lo hacían al aplicar tratamientos de alta presión.

Tabla A4.3. Recuento¹ de esporas y síntomas de hinchazón en las cuñas de los quesos elaborados con esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y tratadas por altas presiones

	Tiempo	Altas presiones	Sin esporas	Con esporas
Esporas	Leche	----	ND	4,92 ± 0,13
	Cuajada (2 h)	----	ND	5,63 ± 0,14
		6 h	ND	3,05 ± 0,04
		1 día	ND	3,08 ± 0,15
		7 días	ND	2,55 ± 0,42
		100 MPa 30 min	ND	2,52 ± 0,38
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	ND	2,08 ± 0,24*
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	ND	2,18 ± 0,21
		400 MPa 15 min	ND	2,38 ± 0,09
		3 x 400 MPa 5 min	ND	2,20 ± 0,24
	60 días	Sin tratamiento	ND	2,65 ± 0,24
		100 MPa 30 min	ND	2,55 ± 0,18
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	ND	1,90 ± 0,19*
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	ND	1,85 ± 0,12*
		400 MPa 15 min	ND	1,93 ± 0,12*
		3 x 400 MPa 5 min	ND	2,01 ± 0,11*
Hinchazón	1 días	----	No	No
	7 días	Sin tratamiento	No	No
		100 MPa 30 min	No	No
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	No	No
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	No	No
		400 MPa 15 min	No	No
		3 x 400 MPa 5 min	No	No
	60 días	Sin tratamiento	No	Si
		100 MPa 30 min	No	Si
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	No	No
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	No	No
		400 MPa 15 min	No	No
		3 x 400 MPa 5 min	No	No

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como log ufc/g de queso. * En la columna, indica que la media difiere ($P < 0,01$, test de Dunnett) de la de su respectiva cuña de queso no tratada por altas presiones a cada tiempo de maduración. ND, no detectado ($< 0,40$ log ufc/g de queso).

Solo presentaron síntomas de hinchazón tardía las cuñas del queso elaborado con esporas de *C. tyrobutyricum* que no fue presurizada y la presurizada a 100 MPa, y a los 60 días (Tabla A4.3). Este resultado unido a los obtenidos para el recuento de esporas, nos llevan a pensar que los tratamientos de 400 MPa aplicados a los 7 días inactivaron las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* procedentes de la germinación de las esporas que germinaron durante el prensado del queso, y que existe una fracción de esporas que nunca germinó durante la maduración del mismo.

Valores de pH y extracto seco

No se apreciaron diferencias significativas de pH entre los quesos de 1 día, que mostraron un valor medio de 5,16 (Tabla A4.4). A los 7 días, las cuñas de queso tratadas por altas presiones mostraron valores de pH superiores a sus respectivas cuñas no tratadas. Este efecto fue reversible, y a los 60 días las cuñas de queso sin hinchazón presentaron un pH equivalente a la cuña del queso elaborado sin esporas de *C. tyrobutyricum* y no presurizada. El aumento instantáneo del pH del queso tras un tratamiento de alta presión ha sido relacionado con la disociación de las micelas de caseína que conduciría a la consiguiente alteración de la red de paracaseínas y a la exposición de grupos alcalinos (Messens y col. 1999). En distintas variedades de queso también se ha descrito un aumento de pH tras la aplicación de distintos tratamientos de alta presión (Martínez-Rodríguez y col. 2012).

En las cuñas de queso con hinchazón (las del queso elaborado con esporas no presurizada y la tratada a 100 MPa), el pH aumentó a los 60 días (Tabla A4.4) como consecuencia de la desacidificación debida a la actividad metabólica de *Clostridium* (Bogovic-Matijasic y col. 2007; Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2012a). Sin embargo, las cuñas del queso con esporas y tratadas a 400 MPa mostraron unos valores de pH similares al de sus respectivas cuñas del queso elaborado sin esporas de *Clostridium* y presurizadas. En los quesos sin hinchazón, los valores de pH disminuyeron una media de 0,12 unidades a los 60 días con respecto a 1 día.

Ni los tratamientos de altas presiones ni la aparición de hinchazón tardía afectaron al extracto seco del queso, ya que no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,01$) entre las cuñas de los quesos a lo largo de la maduración (Tabla A4.4). Sin embargo, el extracto seco fue significativamente ($P < 0,01$) superior a los 60 días de maduración que en el día 1.

Ácidos orgánicos

En las cuñas de queso que no desarrollaron hinchazón tardía, la concentración de ácido láctico disminuyó ($P < 0,01$) durante la maduración, y no se detectó la presencia ni de ácido propiónico ni de ácido butírico en ninguno de ellos (Tabla A4.5). En cambio, en las cuñas de queso con hinchazón y como consecuencia de la fermentación butírica llevada a cabo por *C. tyrobutyricum* INIA 68, se observó un mayor ($P < 0,01$) descenso del contenido de ácido láctico a los 60 días, así como la formación de ácidos propiónico y butírico. Este mismo perfil de ácidos orgánicos ha sido descrito para distintas variedades de queso con hinchazón tardía (Bogovic-Matijasic y col. 2007; Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2011b; 2012a), y a lo largo de distintos apartados de la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, el perfil de ácidos orgánicos en las cuñas del queso con esporas y tratadas a 400 MPa fue similar al de sus respectivas cuñas del queso elaborado sin esporas de *Clostridium* y presurizadas.

Por otra parte, parece que la aplicación de 100 MPa retrasó la aparición de hinchazón tardía, ya que la cuña del queso con esporas tratada a esta presión mostró a los 60 días de manera significativa ($P < 0,01$) mayor nivel de ácido láctico y menores niveles de ácidos propiónico y butírico que la cuña del queso con esporas y no presurizada (Tabla A4.5). Este resultado nos sugirió que las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* eran muy sensibles a la presión, y que tratamientos de alta presión más suaves (inferiores a 400 MPa y/o más cortos) podrían ser efectivos para su control y prevención de la hinchazón tardía en el queso.

Tabla A4.4. Valores de pH¹ y extracto seco² de las cuñas de los quesos elaborados con esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y tratadas por altas presiones

	Tiempo (días)	Altas presiones	Sin esporas	Con esporas
pH	1	----	5,17 ± 0,05	5,15 ± 0,06
	7	Sin tratamiento	5,03 ± 0,07	5,05 ± 0,04
		100 MPa 30 min	5,12 ± 0,02	5,12 ± 0,12*
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	5,15 ± 0,04*	5,19 ± 0,05*
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	5,11 ± 0,11	5,15 ± 0,07*
		400 MPa 15 min	5,06 ± 0,09	5,18 ± 0,02*
		3 x 400 MPa 5 min	5,11 ± 0,11	5,09 ± 0,04
	60	Sin tratamiento	5,01 ± 0,03	5,25 ± 0,05*
		100 MPa 30 min	4,98 ± 0,04	5,18 ± 0,04*
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	4,99 ± 0,05	5,08 ± 0,06*
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	5,08 ± 0,03	5,02 ± 0,04*
		400 MPa 15 min	5,05 ± 0,07	5,04 ± 0,06*
		3 x 400 MPa 5 min	5,07 ± 0,06	5,06 ± 0,06*
E. seco	1	----	54,92 ± 0,44	54,78 ± 0,34
	7	Sin tratamiento	56,00 ± 0,77	55,55 ± 0,13
		100 MPa 30 min	55,98 ± 0,34	55,59 ± 0,77
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	54,85 ± 0,56	54,92 ± 0,64
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	55,44 ± 0,75	55,55 ± 1,07
		400 MPa 15 min	55,00 ± 1,00	55,50 ± 0,75
		3 x 400 MPa 5 min	55,03 ± 0,99	55,44 ± 0,55
	60	Sin tratamiento	58,88 ± 1,37	57,66 ± 1,35
		100 MPa 30 min	59,44 ± 1,24	58,20 ± 1,22
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	59,35 ± 1,10	59,58 ± 1,13
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	57,46 ± 1,67	58,68 ± 1,71
		400 MPa 15 min	58,60 ± 0,79	58,31 ± 1,10
		3 x 400 MPa 5 min	59,46 ± 1,40	59,47 ± 1,44

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones. ² Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como %. * En la columna, indica que la media difiere ($P < 0,01$, test de Dunnett) de la de su respectiva cuña de queso no tratada por altas presiones a cada tiempo de maduración. * En la fila, indica que la media difiere ($P < 0,01$, DMS) de la de su respectiva cuña de queso sin esporas a cada tiempo de maduración.

Tabla A4.5. Concentración¹ de ácidos láctico, propiónico y butírico en las cuñas de los quesos elaborados con esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y tratadas por altas presiones

Ácidos	Tiempo (días)	Altas presiones	Sin esporas	Con esporas
Láctico	1	----	37,19 ± 1,84	39,28 ± 1,02
	60	Sin tratamiento	32,84 ± 4,05	24,21 ± 2,33 [♣]
		100 MPa 30 min	32,12 ± 3,77	26,49 ± 2,14 ^{*♣}
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	32,09 ± 2,94	31,57 ± 1,86 [*]
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	31,92 ± 1,81	31,86 ± 3,11 [*]
		400 MPa 15 min	32,35 ± 3,45	34,10 ± 2,03 [*]
		3 x 400 MPa 5 min	33,03 ± 2,67	31,65 ± 0,98 [*]
	1	----	ND	ND
Propiónico	60	Sin tratamiento	ND	1,53 ± 0,12 [♣]
		100 MPa 30 min	ND	1,05 ± 0,07 ^{*♣}
		100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min	ND	ND [*]
		100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min	ND	ND [*]
		400 MPa 15 min	ND	ND [*]
		3 x 400 MPa 5 min	ND	ND [*]
	1	----	ND	ND
	Butírico	60	Sin tratamiento	ND
100 MPa 30 min			ND	1,28 ± 0,15 ^{*♣}
100 MPa 30 min + 400 MPa 15 min			ND	ND [*]
100 MPa 30 min + 3 x 400 MPa 5 min			ND	ND [*]
400 MPa 15 min			ND	ND [*]
3 x 400 MPa 5 min			ND	ND [*]
1		----	ND	ND

¹ Media ± DS de dos determinaciones en dos fabricaciones, expresada como mg/g de extracto seco de queso. ^{*} En la columna, indica que la media difiere ($P < 0,01$, test de Dunnett) de la de su respectiva cuña de queso no tratada por altas presiones a cada tiempo de maduración. ^{*} En la fila, indica que la media difiere ($P < 0,01$, DMS) de la de su respectiva cuña de queso sin esporas. ND: no detectado.

BIBLIOGRAFÍA

- Arqués JL, Garde S, Gaya P, Medina M, Nuñez M (2006) Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high pressure treatments. *Journal of Dairy Science* 89: 888-891.
- Bogovic-Matijasic B, Rajsp MK, Perko B, Rogelj I (2007) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal* 17: 157-166.
- Casal V, Gómez R (1999) Effect of high pressure on the viability and enzymatic activity of mesophilic lactic acid bacteria isolated from caprine cheese. *Journal of Dairy Science* 82: 1092-1097.
- Garde S, Ávila M, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2011b) Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150: 59-65.
- Garde S, Ávila M, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2012a) Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal* 25: 87-91.
- Gould GW, Sale AJH (1970) Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology* 60: 335-346.
- Juan B, Ferragut V, Buffa M, Guamis B, Trujillo AJ (2007b) Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science* 90: 2113-2125.
- Le Bourhis AG, Dore J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL (2007) Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology* 113: 154-163.
- Martínez-Rodríguez Y, Acosta-Muñiz C, Olivas GI, Guerrero-Beltrán J, Rodrigo-Aliaga D, Sepulveda DR (2012) High hydrostatic pressure processing of cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 399-416.
- Messens W, Estepar-Garcia J, Dewettinck K, Huyghebaert A (1999) Proteolysis of high-pressure-treated Gouda cheese. *International Dairy Journal* 9: 775-782.
- O'Reilly CE, O'Connor PM, Murphy PM, Kelly AL, Beresford TP (2002) Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 12: 915-922.

Capítulo 5

Control y detección de *Clostridium* spp. mediante endolisinas fágicas

Prefacio

Los bacteriófagos y sus endolisinas constituyen excelentes herramientas para el control de microorganismos indeseables en alimentos debido a su capacidad para reconocer específicamente y lisar eficazmente las células diana sin afectar a una posible microbiota secundaria beneficiosa. Las endolisinas tienen un espectro de acción limitado y relativamente específico, aunque mayor que el de los fagos parentales, un efecto bactericida rápido, son inocuas y no se conoce que generen resistencias, y su uso ha sido ensayado con éxito frente a distintos patógenos alimentarios. Por ello, en el Objetivo 6 nos planteamos que el empleo de las mismas podría ser una estrategia interesante para controlar el crecimiento de *Clostridium* spp. en el queso, y prevenir así la hinchazón tardía.

En nuestro trabajo, evaluamos la capacidad lítica de la endolisina CTP1L codificada por el bacteriófago virulento Φ CTP1 de *C. tyrobutyricum*, frente a 6 cepas de *C. tyrobutyricum*, 3 cepas de *C. sporogenes*, 2 cepas de *C. butyricum* y 9 cepas de *C. beijerinckii*, la mayoría aisladas de quesos Manchego con hinchazón tardía. Este trabajo no ha sido publicado pero hemos incluido una tabla con los resultados como apéndice a este Capítulo, y la discusión de los mismos se encuentra en la discusión general de esta Tesis.

Como no se observó actividad lítica de la endolisina frente a ninguna de las cepas de *Clostridium* aisladas de quesos con hinchazón, nos planteamos su posible aplicación como método para detectar *Clostridium* spp. en queso.

A continuación se presentan los resultados de este estudio en forma de dos publicaciones científicas, una se encuentra en fase de revisión y la otra en preparación:

Publicación 5.1. Gómez-Torres N., Dunne M., Garde S., Meijers R., Narbad A., Ávila M., Mayer M.J. Development of a specific fluorescent phage endolysin for *in situ* detection of *Clostridium* species associated with cheese spoilage. Microbial Biotechnology (en revisión).

Publicación 5.2. Gómez-Torres N., Ávila M., Narbad A., Mayer MJ, Garde S. Use of fluorescent CTP1L endolysin cell wall-binding domain to study the evolution of *Clostridium tyrobutyricum* during cheese ripening. Food Control (en preparación).

Development of a specific fluorescent phage endolysin for in situ detection of *Clostridium* species associated with cheese spoilage

Journal:	<i>Microbial Biotechnology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gomez Torres, Natalia; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos Dunne, Matthew; European Molecular Biology Laboratory Hamburg Avila, Marta; Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos Narbad, Arjan; Institute of Food Research, Gut Health and Food Safety ISP Mayer, Melinda; Institute of Food Research, Gut Health and Food Safety ISP
Keywords:	bacteriophage, endolysin, detection, <i>Clostridium</i> spp., late blowing defect, cheese

Development of a specific fluorescent phage endolysin for *in situ* detection of *Clostridium* species associated with cheese spoilage

Natalia Gómez-Torres¹, Matthew Dunne^{2†}, Sonia Garde¹, Rob Meijers², Arjan Narbad³, Marta Ávila^{1**}, Melinda J. Mayer^{3*}

¹ Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain.

² European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Hamburg Outstation, Notkestrasse 85, 22607 Hamburg, Germany.

³ Gut Health and Food Safety Institute Strategic Programme, Institute of Food Research, Colney, Norwich, UK, NR4 7UA.

For correspondence. *Email: melinda.mayer@ifr.ac.uk; Tel. +44 1603 255284; Fax +44 1603 507723. **Email arribas@inia.es; Tel. +34 91 3476921; Fax +34 91 3572293.

Running title: Fluorescent endolysin to detect *Clostridium* spp

[†]current address: Institute of Food, Nutrition and Health, ETH Zurich, LFV B36, Schmelzbergstr. 7, 8092 Zurich, Switzerland

Summary

Late blowing defect (LBD) is a major cause of spoilage in cheeses, caused by the growth of *Clostridium* spp in the cheese matrix. We investigated the application of CTP1L, a bacteriophage endolysin active against *Clostridium tyrobutyricum*, and its enzymatically active and cell wall-binding domains (EAD and CBD) attached to green fluorescent protein (GFP) to detect dairy-related *Clostridium* species by fluorescence microscopy. GFP-CTP1L and GFP-CBD demonstrated specificity for *Clostridium* spp. by labelling 15 and 17 of 20 *Clostridium* strains respectively, but not binding to other members of the cheese microbiota. However, GFP-EAD did not label any *Clostridium* strain tested. Unexpectedly, GFP-CTP1L and GFP-CBD were also able to bind to clostridial spores. In addition, GFP-CBD allowed us to visualise the vegetative cells of *C. tyrobutyricum* directly in the matrix of a LBD cheese. Site-directed mutants of GFP-CTP1L and GFP-CBD were made to examine the amino acids involved in binding and oligomer formation. Oligomerisation was not essential for binding, but specific mutations in the CBD which affected oligomer formation also affected binding and lytic activity.

We conclude that GFP-CTP1L and GFP-CBD could be good biomarkers for rapid detection of *Clostridium* spores in milk, so measures can be taken for the prevention of LBD in cheese, and also provide effective tools to study the development of *Clostridium* populations during cheese ripening.

Keywords: Bacteriophage, endolysin, detection, *Clostridium* spp., late blowing defect, cheese

Introduction

Butyric acid fermentation, also known as late blowing defect (LBD), is an important problem to the cheese industry and without appropriate controls can cause severe economic losses (Garde *et al.*, 2013). It is a major cause of spoilage in semi-hard and hard ripened cheeses, resulting in texture and flavour defects including the formation of irregular cracks in the cheese paste and a rancid taste. LBD is caused by the outgrowth of anaerobic, gram-positive spore-forming species of the genus *Clostridium*, capable of fermenting lactic acid with the production of butyric acid, acetic acid, carbon dioxide and hydrogen. *Clostridium tyrobutyricum* is considered the primary cause, but other species such as *Clostridium sporogenes*, *Clostridium beijerinckii* and *Clostridium butyricum* have also been shown to contribute (Klijn *et al.*, 1995; Cocolin *et al.*, 2004; Le Bourhis *et al.*, 2005; Le Bourhis *et al.*, 2007). *Clostridium* spores are ubiquitous, highly resistant to heat, chemicals, irradiation, pressure and desiccation and can persist in the environment for a long time. Traditional methods for detecting clostridia are based on spore germination and vegetative growth. Detecting *Clostridium* in dairy products is still a challenge: the commonly used most probable number techniques are time-consuming, requiring long periods of incubations, and fail to differentiate among spore formers at the species level. In recent years, molecular methods have overcome the limitations of cultivation-based approaches to detect spoilage bacteria within 24 h in milk or dairy products using PCR (Herman *et al.*, 1995; Klijn *et al.*, 1995; Herman *et al.*, 1997; Cocolin *et al.*, 2004; Le Bourhis *et al.*, 2007). More recently, real-time PCR protocols have been developed for *C. tyrobutyricum* cell and spore enumeration in feed, faeces and dairy samples (Bassi *et al.*, 2013) and for the simultaneous detection of *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* and *C. tyrobutyricum* in milk samples (Morandi *et al.*, 2015). PCR-based detection has been studied because of its specificity, high sensitivity and avoidance of enrichment culturing. However, DNA extraction efficiency may be decreased by a wide range of substances coming from the cheese matrix itself (Bonaiti *et al.*, 2006). Moreover, even if DNA yield is high, inhibitors may lower PCR sensitivity (Wilson, 1997). Few other non-cultural methods, recently reviewed by Brändle *et al.* (Brandle *et al.*, 2016), have been proposed to detect *C. tyrobutyricum*. Immunological approaches are considered very specific, but these methods have low sensitivity. As an alternative to antibody ligands, Lavilla *et al.* (Lavilla *et al.*, 2012) produced superparamagnetic beads coated with specific peptides to specifically bind *C. tyrobutyricum* spores for concentration of spores prior to detection.

The use of bacteriophage endolysins could be an alternative technique to detect spoilage *Clostridium* in milk and cheese. The applications of bacteriophages and their endolysins in food safety have been extensively reviewed (Gutierrez *et al.*, 2016; Schmelcher and Loessner, 2016). Bacteriophages are the most abundant self-replicating entities on the planet and have been optimised by millions of years of evolution to specifically recognise and effectively kill their target cells (Hendrix, 2002). Endolysins are peptidoglycan hydrolases, encoded by the genomes of lytic

phages and produced at the end of their multiplication cycle to lyse the host cell and release the phage progeny (Loessner, 2005; Fischetti, 2010). Endolysins from a gram-positive phage-host background are generally characterised by a modular architecture, featuring distinct enzymatically active domains (EAD) and cell wall-binding domains (CBD). The EADs digest the cell wall peptidoglycan layer and can be classified based on their catalytic activity (muramidases, glucosaminidases, lytic transglycosylases, amidases or endopeptidases). The CBDs direct the endolysin to specific cell wall-associated ligands with high specificity and strong binding affinity (Loessner, 2005; Schmelcher *et al.*, 2010; Schmelcher *et al.*, 2011). The specificity of the CBD has been applied in bacterial detection systems, because it allows the direct targeting of bacteria while leaving the background flora unaffected (Kretzer *et al.*, 2007; Schmelcher *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2016). Fusion of a bacteriophage endolysin CBD with green fluorescent protein (GFP) produces a fluorescent probe that is able to rapidly recognise and bind to the host cells of a given species or even to individual serovars (Loessner *et al.*, 2002; Schmelcher *et al.*, 2011). Endolysins are considered safe due to their highly conserved target sites and the limited number of possible resistance mechanisms (Schmelcher *et al.*, 2012), leading to increasing interest in possible food safety applications. However, few studies have investigated the efficacy of phage endolysins in food products compared to reports on clinical applications (Schmelcher and Loessner, 2016). In addition, there is a shortage of studies on their use as a biocontrol strategy or as a detection system against spoilage bacteria like *C. tyrobutyricum*.

Mayer *et al.* (Mayer *et al.*, 2010) isolated the endolysin of Φ CTP1, a bacteriophage infecting *C. tyrobutyricum*, and demonstrated *in vitro* its ability to lyse *C. tyrobutyricum* cells and control bacterial levels in buffer and in milk. In a recent study, a crystal structure of the activated endolysin CTP1L consisting of a complex between the full length protein and an N-terminally truncated C-terminal CBD was presented (Dunne *et al.*, 2016). The main purpose of this study was to investigate the application of the CTP1L endolysin and its N- and C-terminal domains, attached to GFP, to specifically detect *Clostridium* species responsible for LBD in cheese by fluorescence microscopy. Furthermore, site-directed mutants of GFP-CTP1L and GFP-CBD were investigated in order to shed light on the interactions between endolysin structure and lytic and binding activities.

Results

CTP1L C-terminal domain mediates endolysin binding to cells

The crystal structure of the full length CTP1L endolysin was recently solved by Dunne *et al.* (Dunne *et al.*, 2016), showing an EAD (residues 1–190) connected by a linker of four residues to a CBD (residues 195–274), which was confirmed to bind to *C. tyrobutyricum*. To investigate the cell wall binding activity of the full length CTP1L and its CBD and EAD domains separately,

constructs were N-terminally tagged with GFP (Fig. 1) and tested with vegetative cells of *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582. GFP-CTP1L and GFP-CBD both showed clear and strong binding to the entire surface of clostridial cells, while cells incubated with GFP-EAD or the GFP-linker control produced from pET15b were not labelled, although a faint outline of clostridial cells was visible due to native autofluorescence (Fig. 2).

When the binding ability of GFP-labelled CTP1L and its CBD was assessed under different conditions, fluorescent labelling was found to be optimal with reaction conditions of 20 min at 37°C, although binding was also demonstrated using shorter incubation times (5, 10 min) and lower temperatures (30°C and room temperature, 20-25°C). Varying the NaCl concentration (2, 1, 0.5, 0.2 M) did not affect binding, but reducing the pH of the incubation buffer from 7.40 to 5.2 decreased fluorescence. GFP-labelled proteins bound both exponential and stationary phase cells, but a higher fluorescence signal was observed for the latter. In addition, using boiled clostridial cells resulted in stronger binding of GFP-endolysins than to fresh cells (Fig. S1).

CTP1L binds specifically to Clostridium spp.

We investigated the binding of GFP-CTP1L, GFP-EAD, and GFP-CBD to vegetative cells of different clostridial species, most of them isolated from Manchego cheeses with LBD (Table 1). GFP-CTP1L and GFP-CBD bound to 15 and 17, respectively, out of 20 *Clostridium* strains tested, including strains which had been demonstrated to cause LBD (Gomez-Torres *et al.*, 2015) and all the *C. tyrobutyricum* strains. However, GFP-EAD and the GFP-linker control did not bind to any *Clostridium* strain tested. Cell fluorescence was more intense for GFP-CBD than for the full length GFP-CTP1L binding in the case of *C. tyrobutyricum* CECT 4011 and INIA 69 strains. In addition, GFP-CBD was able to bind to two *C. beijerinckii* strains (LMG 5716 and INIA 73) that did not show binding with GFP-CTP1L.

To study the level of specificity of GFP-CTP1L and GFP-CBD, binding assays were performed with lactic acid bacteria belonging to the cheese microbiota, including several commercial cheese cultures widely used in cheese manufacture. No fluorescence was observed by microscopy (Table 2), suggesting that these proteins have a genus-level of specificity which makes them potentially useful for detecting *Clostridium* spp. in milk and cheese matrices.

CTP1L is able to bind to Clostridium spores

We tested the ability of GFP-CTP1L and GFP-CBD to bind to spores of *Clostridium* spp. Although lysis and separation protocols were applied to get pure cultures of spores, we only obtained a culture without vegetative cells or their debris from *C. beijerinckii* INIA 77. Surprisingly, GFP-CTP1L and GFP-CBD were both able to label spores of *C. beijerinckii* INIA 77, while the GFP-

linker control did not bind (Fig. 3). Binding of GFP-CTP1L and GFP-CBD was also seen to spore preparations from several other clostridial species (Table 2).

Effect of specific mutations on binding activity

In order to investigate the amino acids involved in endolysin binding, we made GFP-labelled constructs of mutants of the wild type CTP1L and its CBD which had previously been shown to affect CTP1L dimerisation and lytic activity ((Dunne *et al.*, 2014; Dunne, 2014; Dunne *et al.*, 2016), Fig. 1A). The wild type enzyme exists in solution as a heterotetrameric complex, consisting of two full length CTP1L proteins and two truncated CBDs (tCBD) expressed from an internal translational start site within the CTP1L gene (Fig. 1B (Dunne *et al.*, 2016)). Dunne *et al.* (Dunne *et al.*, 2016) showed that two modes of dimerisation, side-by-side (CBD to tCBD) and head-on interaction (CBD to CBD and tCBD to tCBD), can exist between the four CBDs at the centre of the enzyme complex, with the activated endolysin consisting of a heterodimer with the side-by-side interaction. Mutation RBSKO (ribosomal binding site knockout) destroys the internal translation site that makes the tCBD, keeping the enzyme as a monomer and reducing lytic activity at low enzyme concentrations; this mutation can be partially rescued by the addition of free CBD (Dunne *et al.*, 2016). Mutation T221R affects side-by-side binding of two CBD units; previous work showed that this mutation abolishes lytic activity and SDS-PAGE analysis suggested that the mutant protein does not form a complex with tCBD (Dunne *et al.*, 2014). Mutations M263R and D215A occur at the base of the CBD and were designed to prevent head-on dimer formation. When His-tagged wild type CTP1L is purified by Ni-NTA chromatography, attached tCBDs are co-purified then are separated from the complex by denaturing SDS-PAGE ((Dunne *et al.*, 2016), Fig. 4A); gel analysis suggests that CTP1L-M263R can still interact with its tCBD (Fig. 4A), but the mutant does not have lytic activity (Fig. 4B). D215A forms electrostatic interactions in the head-on interface and also plays a role in interacting with the side-by-side dimer - its mutation was previously shown to convert CTP1L to a monomer but there is a minimal presence of oligomeric species (Dunne *et al.*, 2014). We found that this mutation also renders the endolysin inactive (Fig. 4C).

Mutant proteins fused to GFP were produced either as CBDs (GFP-CBD_D215A, GFP-CBD_M263R, GFP-CBD_T221R) or as full length proteins (GFP-CTP1L_D215A, GFP-CTP1L_RBSKO). Each mutant construct was evaluated for binding to fresh vegetative cells of *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 in the stationary phase (Fig. 5). GFP-RBSKO was the only mutant able to bind the *C. tyrobutyricum* cells to a similar extent as its counterpart GFP-CTP1L. Proteins with M263R and D215A mutations displayed binding only to a few specific cells. Upon detailed observation under contrast phase microscopy it appeared that only lysed cells were labelled by these mutants. To verify this observation, we treated *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 cells with

lysozyme before the binding assay. In contrast to untreated cells, the vast majority of lysozyme-treated cells were labelled with GFP-CBD_D215A, GFP-CBD_M263R mutants and, to a lesser extent, GFP-CTP1L_D215A mutant (Fig. 5). We also observed more intensive binding of GFP-CTP1L, GFP-CBD and GFP-RBSKO to lysozyme-treated *C. tyrobutyricum* cells. In contrast, GFP-CBD_T221R did not show binding to fresh or lysozyme-treated cells.

We investigated if cell binding was modulated by the addition of free CTP1L CBD, His-tagged at the C terminus (CBD-His). We found that the addition of CBD-His to binding assays with GFP-labelled endolysins was slightly detrimental for GFP-CTP1L and GFP-RBSKO binding (Fig. 6). However, the binding of GFP-CBD_D215A and GFP-CBD_M263R and to a lesser extent GFP-CTP1L_D215A was slightly improved after CBD-His addition. The GFP-CBD_T221R mutant still did not label the target cells in the presence of CBD-His, although some protein precipitation was observed.

Detection of C. tyrobutyricum in cheese using GFP-CBD

GFP-CBD and GFP-linker control were tested with an 8 month-old LBD cheese made with milk artificially contaminated with spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68, to test direct detection of the bacterium in the cheese matrix. The LBD cheese contained 2.45 spores/g while no spores were detected from uninoculated cheese (detection limit 3 spores/g). In agreement with the culture experiments, GFP-CBD was able to label the vegetative cells of *C. tyrobutyricum* INIA 68, responsible for the appearance of LBD of cheese (Fig. 7), while the GFP-linker control did not produce any fluorescence (data not shown). When the binding protocol was applied to control cheese made with the same starter cultures, MA 11 and TA 54, but without clostridial spores and without LBD, cells with green fluorescence were not observed (Fig. 7), supporting the specificity of GFP-CBD binding.

Discussion

Clostridium tyrobutyricum and related *Clostridium* spp. pose a threat to the dairy industry, causing severe economic losses due to cheese spoilage. Dormant clostridial spores may be activated during cheese manufacture and ripening, giving rise to metabolically active vegetative cells able to grow in the cheese. Cultural and culture-independent methods for the detection of *Clostridium* spp. in cheese are available but present some disadvantages (Garde *et al.*, 2013). Fluorescently-labelled CBDs have been proposed as alternative tools for detection of microorganisms due to their high host-specific binding (Bai *et al.*, 2016), and they have possible application to directly detect *Clostridium* spp. in cheeses without the need for isolation.

Endolysin CTP1L consists of an EAD at the N-terminus, encoding a glycosyl hydrolase of the GH25 type, and a CBD at the C-terminus, with both domains connected by a short linker of four

residues (Dunne *et al.*, 2016). Previously, we determined that the truncated EAD of CTP1L failed to lyse *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 cells (Mayer *et al.*, 2010); our current results confirm that the C-terminal domain is required for the binding of CTP1L to the outside of cells, suggesting that this is necessary for lytic activity. It is known that some endolysins, including GH25-type endolysins (Sanz *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 2007; Sugahara *et al.*, 2007), require a CBD for full lytic activity from without, while the EADs of other endolysins maintain or even increase activity in the absence of their CBD (Schmelcher *et al.*, 2012; Rodriguez-Rubio *et al.*, 2016). The *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase EADs of clostridial endolysins CD27L and CS74L showed similar or increased lytic activity and the same host range as their full length endolysins, and GFP-labelled CD27L EAD showed strong binding to *C. difficile* (Mayer *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2012). The ability of the EAD to act on its own may be related to its cell wall binding activity.

We evaluated the binding affinity of GFP-labelled CTP1L and the CBD to *C. tyrobutyricum* cells at different conditions. Optimal binding was observed at pH 7, however, fluorescence intensity decreased when pH of the buffer was lowered to 5.2. CTP1L retains lytic activity at pH 4.5 and 5.5 (Mayer *et al.*, 2010) and therefore the decrease in cell fluorescence may be due to impaired GFP fluorescence, which is influenced by changes in pH (Ward and Bokman, 1982). Stationary cells were more strongly labelled by GFP-CTP1L and GFP-CBD than exponential cells. This might be due to changes in the cell wall structure that render the binding ligand more available, or to a more prevalent expression of the ligand in the stationary phase. It has recently been reported that the CBDs of *Bacillus anthracis* phage endolysins are able to recognise cell culture age-related features on the bacterial surface (Paskaleva *et al.*, 2015). Boiling or freezing *Clostridium* cells also increased the binding efficiency of CTP1L and its CBD. This might be the result of alterations to the structure of the cell wall or conformational changes in certain components on the cell surface which may increase ligand accessibility.

To broaden our understanding of the relationship between structure and function for the CTP1L CBD we used GFP-labelled proteins to analyse how different mutations within the CBD affected its binding ability. Shutting down the internal translation site of CTP1L to stop tCBD production (RBSKO mutant) did not prevent binding of endolysin to *C. tyrobutyricum* cell walls when in high concentrations (3 μ M), indicating that the formation of an oligomer with free CBD is not essential for binding in this *in vitro* scenario. This is corroborated by the observation that the reduction in lytic activity shown by the RBSKO mutation at low (0.1 μ M) lysin concentration was not apparent when high concentrations of protein were used (1 μ M, (Dunne *et al.*, 2016)). Oligomerisation may have more impact on the efficacy of binding at physiological concentrations. Mutagenesis disrupting the head-on (M263R and D215A) or side-by-side (D215A, T221R) dimerisation interfaces abolished attachment of the endolysin to the external host cell wall, suggesting that, apart from their role in the association with other CBDs, these residues might be involved in successful

binding to target ligands. The inability of these mutated endolysins to bind to cells was matched by their lack of lytic activity. However, D215A and M263R mutants were able to bind to cells which had been treated with lysozyme – this treatment might make the target ligand more accessible, or mutants might be able to bind to a different ligand than the external cell wall receptor, which became accessible after lysis. The treatment may also allow the lysin to access the wall from the inside of the cell, as it has evolved to do. In contrast, lysozyme treatment did not enable binding of the T221R mutant, indicating that this mutation has a greater impact on protein structure and/or binding.

The addition of free CBD-His was counterproductive for the binding of the wild type GFP-CTP1L and the RBSKO mutant; these results most likely reflect a competition for cell binding epitopes, as suggested previously (Dunne *et al.*, 2016). The addition of CBD-His to M263R and D215A mutants gave a limited increase in binding to the clostridial cell wall, suggesting that there had been some oligomerisation with the functional CBD-His but that either the extent of oligomerisation or the structure of the final complex were not sufficient to produce significant binding. It is interesting that addition of CBD-His to the M263R mutant, which can form strong side-by-side interactions, did not show any greater improvement than to the more disruptive D215A mutation. The results of the T221R mutant suggest that either this mutant cannot form oligomers with the CBD-His, or the formed complex is still unable to bind to the surface of *C. tyrobutyricum* cells.

GFP-CTP1L and GFP-CBD showed a *Clostridium*-level of binding specificity, with GFP-CBD showing a slightly broader range. The smaller size of GFP-CBD could facilitate its access to target ligands within *Clostridium* cell walls. Different levels of binding specificity have been described for bacteriophage endolysins. A GFP fusion protein of CPF369_CBD, a putative CBD identified from the genome of *C. perfringens* ATCC 13124, only bound to *C. perfringens* cells (Kong and Ryu, 2016) while a GFP fusion protein of the C-terminal domain of PlyL, an endolysin encoded by a *Bacillus anthracis* prophage, bound to *Bacillus cereus* but not to *Bacillus megaterium* or *Bacillus subtilis* cells (Low *et al.*, 2005). A fusion of EGFP (enhanced GFP) with PlyG, an endolysin produced by gamma phage, or its truncated C-terminal domains, specifically recognised *B. anthracis* cells (Yang *et al.*, 2012) while an EGFP fusion protein of the C-terminal domain of LysPBC4, the endolysin of a *B. cereus*-specific bacteriophage, could only decorate limited strains of *B. cereus* (Na *et al.*, 2016). In the case of non spore-forming bacteria, GFP-CBDs of *Listeria* phage endolysins Ply500, Ply118 and PlyP35 only bound to the *Listeria* genus and showed binding specificity at species and even serovar level (Loessner *et al.*, 2002; Schmelcher *et al.*, 2010). However, GFP-CBD of Lyb5 endolysin of bacteriophage ϕ PYB5, isolated from *Lactobacillus fermentum*, also bound to *L. lactis* and *Lactobacillus casei* cells (Hu *et al.*, 2010) while GFP-CBD of BFK20 endolysin from corynephage BFK20 infecting *Brevibacterium flavum* CCM 251 bound

to *Brevibacterium* and *Corynebacterium* cells with different binding abilities (Gerova *et al.*, 2011). GFP fusion protein of LysGH15B, a staphylococcal phage lysin, showed binding specificity to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, but did not bind to all staphylococcal strains tested (Gu *et al.*, 2011). Similarly, GFP-CBD did not bind successfully to all *Clostridium* spp. cheese isolates tested, and it will be important to ascertain whether strains which were not detected are potential causative agents of LBD, and whether modification of the labelled CBD could improve detection. This variation in binding to different species and under different conditions, together with the potential for a varied number of lysin molecules to bind to each cell, means that fluorescence detection using GFP-labelled lysins would not be an accurate method for quantification of cells. However, specific cell wall binding domains do have the potential to improve quantification methods – Walcher *et al.* (Walcher *et al.*, 2010) used paramagnetic beads coated with a CBD from a *Listeria* phage to capture *Listeria monocytogenes* from milk which was then quantified by real-time PCR.

Although some authors (Mayer *et al.*, 2010; Nakonieczna *et al.*, 2015) have pointed out that endolysins may not bind to spores due to the differences in cell wall composition compared to vegetative cells, CTP1L and its CBD successfully bound to spores. This suggests that GFP-CTP1L and GFP-CBD could be good biomarkers for rapid detection of *Clostridium* spores in milk, so that measures can be taken for the prevention of LBD in cheese. This is the first time that an endolysin has been found to bind to *Clostridium* spores, and to our knowledge, there is only one previous study that describes the binding of an endolysin to bacterial spores. EGFP-PlyG bound to spores and vegetative cells of *B. anthracis*, but the endolysin uses different domains to recognise them (Yang *et al.*, 2012). Further studies are necessary to establish if CTP1L uses different domains to target spores and vegetative cells as in the case of PlyG, or whether the *C. tyrobutyricum* cell wall and spore share an epitope recognised by the CBD.

Most methods for detecting *C. tyrobutyricum* are based on spore germination and vegetative growth. GFP-CBD allowed us to visualize directly and specifically for the first time the vegetative cells of *C. tyrobutyricum* in the matrix of a LBD cheese. In addition, GFP-CBD specifically targeted *Clostridium* strains in diverse cellular stages and conditions. This makes GFP-CBD a potentially beneficial agent for rapid and specific detection and tracking of *Clostridium* populations throughout cheese manufacturing (milk to whey and curd), ripening (unripe to mature cheese) and final product storage.

Experimental Procedures

Bacterial strains and growth conditions

Strains of *Clostridium* spp. were obtained from the NCIMB (Aberdeen, UK), the ATCC (Virginia, USA), the CECT (Valencia, Spain), the BCCM/LMG (Ghent, Belgium), or from the INIA in-house

collection of *Clostridium* strains isolated from Manchego cheese with LBD (Madrid, Spain, (Garde *et al.*, 2011; Garde *et al.*, 2012)). *Clostridium* strains were maintained in Robertson's cooked meat medium (SGL, Corby, UK) at room temperature and were grown anaerobically in a controlled anaerobic cabinet (A95 anaerobic workstation, Don Whitley Scientific Ltd in an atmosphere of 5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂), or in jars with an H₂ plus CO₂ generating kit (AnaeroGen, Oxoid) at 37°C in Reinforced Clostridial Medium (RCM, Oxoid) for 24-48 h. *Escherichia coli* strains (Invitrogen) were grown at 37°C with shaking in LB broth (10 g/l Bacto tryptone, 5 g/l yeast extract [Difco], 10 g/l NaCl, pH 7.5) for 24 h. Lactic acid bacteria were obtained from IFR (Norwich, UK) and INIA collections. *Lactococcus lactis* strains were grown at 30°C in M17 broth (Difco) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose (GM17) for 24 h; *Enterococcus* spp were grown at 37°C in brain heart infusion broth (BHI, Oxoid) for 24 h; *Lactobacillus reuteri* 1063N (Mackenzie *et al.*, 2010) was grown in de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, Oxoid) at 37°C for 24 h. Commercial cheese starter cultures were ChoozitTM MA 11 (Danisco) containing *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* strains, ChoozitTM TA 54 (Danisco) containing *Streptococcus thermophilus* strains, FD-DVS FLORA DÁNICA (Chr Hansen) consisting of *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* strains, and RSF 636 (Chr Hansen) formed by *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *S. thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* strains. Commercial starter cultures were suspended in sterile 0.1% (wt/vol) peptone solution (Difco) and diluted to an appropriate concentration for endolysin binding assays.

Spore production and purification

Sporulation of seven *Clostridium* strains was induced by two different protocols. *C. tyrobutyricum* CECT 4011 and INIA 68 were grown anaerobically at 37°C in modified RCM (without agar) for 3 d. Spores/cells suspensions were centrifuged (10,000 x g, 15 min), resuspended in 1 ml sterile milliQ water and stored at -30°C. Other Clostridial strains for spore preparation were grown anaerobically in RCM broth at 37°C for 3 d then streaked onto RCM agar plates. After 3 d incubation in anaerobic conditions at 37°C, spores/cells were collected from the plate with a swab, resuspended in 1 ml sterile milliQ water and stored at -30°C.

To separate vegetative cells and cellular debris and force the release of the spores from the mother cells, the spore/cell suspensions were subjected to a lysis protocol, modified from Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2009). 1 ml spore/cell suspension was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in 5 ml lysis buffer (1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M EDTA, 1 M NaCl, 0.5% N-lauroylsarcosine sodium salt, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate) containing 1 mg/ml lysozyme (Fluka) and 20 U/ml mutanolysin (Sigma), incubated with gentle shaking at 37°C in a water bath for 1 h and sonicated for 10 min. These two steps were repeated once again with

fresh lysis buffer. Spores were washed 10 times with sterile milliQ water. Finally, the pellet was resuspended in 100 µl PBS-T (PBS, 0.01% Tween 20, pH 7.4) and frozen at -30°C. *C. beijerinckii* INIA 77 was not subjected to this lysis and sonicating protocol since it was able to release the spores from the mother cells by itself. In this case, after collecting spores/cells from the streak RCM plate, the suspension was incubated overnight with lysozyme (400 µg/ml, Sigma) at 42°C and spores were separated from vegetative cell debris in a Percoll® gradient (Sigma) by centrifugation at 4,000 x g for 30 min at 4°C, as previously described (Leuschner *et al.*, 1999). Spores, appearing at the bottom of the gradient, were harvested, washed 10 times, resuspended in sterile milliQ water and stored at -30°C until used. The presence of clean refringent spores was confirmed using phase-contrast microscopy.

Production of GFP-labelled endolysins and site-directed mutants

The full length endolysin CTP1L sequence is available in the ΦCTP1 nucleotide sequence under accession number HM159959, phiCTP1_gp29 (Mayer *et al.*, 2010). CTP1L-T221R and CTP1L-D215A were described previously (Dunne *et al.*, 2014); CTP1L-M263R was made in the same way using the Quikchange method (Stratagene) and primers M263R_F and M263R_R (Table S1). Translational fusions of GFP and CTP1L were created by splice overlap extension PCR (Horton *et al.*, 1989). PCR was performed in 2 steps using Phusion polymerase (Finnzymes) and primers listed in Table S1. The GFP gene and a flexible linker were amplified from construct *gfp-linker-pET15b* (Mayer *et al.*, 2011) using primer pET15_F, located in the pET15b vector upstream of the NdeI cloning site and splice primer GFPspliceCTP1L_R, consisting of 15 nt to match the end of the linker and 17 nt (underlined) to match the start of the CTP1L gene. The CTP1L gene was amplified from the construct *ctp1l-pET15b* (Mayer *et al.*, 2010) using primer pET15_R located in the pET15b vector downstream of the BamHI-HF cloning site and splice primer CTP1LspliceGFP_F consisting of 16 nt to match the GFP linker followed by 17 nt to match the start of the CTP1L gene (underlined). The CTP1L N-terminal domain (EAD) was amplified from a construct containing CTP1L truncated by a stop codon after the Asn197 codon cloned into pET15b (Mayer *et al.*, 2010) using pET15_R and CTP1LspliceGFP_F. Primary PCR products were then spliced to create hybrid genes using outer primers pET15_F and pET15_R and annealing conditions calculated to allow the overlapping central portions to anneal. The spliced products were restricted with NdeI and BamHI-HF (New England Biolabs) and cloned into pET15b (Novagen) similarly restricted then dephosphorylated with Antarctic Phosphatase (New England Biolabs), using Fastlink ligase (Epicentre). Ligation products were transformed into chemically competent *E. coli* TOP10 cells (Invitrogen) or electrocompetent *E. coli* DH5α, and transformants were selected with ampicillin (100 µg/ml). Inserts were confirmed by sequencing and constructs were transformed into electrocompetent *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) for expression.

GFP-CBD_D215A, GFP-CBD_T221R, GFP-CBD_M263R, GFP-CTP1L_D215A and GFP-RBSKO mutants (Fig. 1A) were made in the same way using splice overlap PCR. GFP-CBD_D215A, GFP-CBD_T221R, GFP-CBD_M263R were created by amplification of two products from *gfp-ctp1lcbd*-pET15b (Dunne *et al.*, 2016) using primers to insert the relevant mutation combined with pET15_F (D215A_R, T221R_R and M263R_R respectively) and pET15_R (D215A_F, T221R_F and M263R_F respectively). GFP-CTP1L_D215A was prepared in the same way but from construct *gfp-ctp1l*-pET15b. Product pairs were then spliced, restricted and subcloned as before. GFP-RBSKO was prepared from two sets of splice overlap reactions. Plasmid *ctp1lSSSS*-pET15b (Dunne *et al.*, 2016) was used with pET15_F and SSspliceCTP1L_R and *ctp1l*-pET15b was used with pET15_R and CTP1LspliceSS_F; splicing these products recreated the RBSKO sequence K190S_G191S. The mutant RBSKO-CTP1L sequence was then spliced to GFP in the same way as the wild type CTP1L as described above.

Protein expression and analysis

The expression of GFP-labelled proteins in *E. coli* BL21 (DE3) was induced with 0.5 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, Melford). Crude protein lysates from induced cultures were produced by cell disruption as described previously (Mayer *et al.*, 2008). His-tagged endolysins were partially purified under native conditions using nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose (Qiagen); proteins were recovered in elution buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0). Protein production was routinely induced for 4 h at 37°C, but GFP-CTP1L_D215A was induced overnight at 21°C to improve yield. Proteins were quantified using Bradford reagent (Bio-Rad) and visualised on 10% NuPage Novex bis-Tris gels in MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) buffer, stained with Simply Blue Safestain (Invitrogen). Lytic activity was measured by turbidity reduction assays using frozen cells with 1 μ M endolysin as described previously (Mayer *et al.*, 2010).

Binding of GFP-labelled proteins was first tested with *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 as before (Loessner *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2011) with some modifications. In brief, bacterial cells were grown for 24 h in their optimal medium and conditions. Cells were harvested by centrifugation (13,000 x g, 2 min), resuspended in 1/10 volume of PBS-T and stored on ice. Subsequently, equal volumes of cells and GFP-labelled endolysins or GFP-linker negative control at a final concentration of 3.0 μ M protein were mixed and incubated at 25, 30 or 37°C for 5, 10 or 20 min at pH 7.4 (PBS-T) or 5.2 (PBS-T adjusted with 1 M HCl). Different concentrations of NaCl (2, 1, 0.5, 0.2 M) were also tested. Cells were then removed from the supernatant by centrifugation (13,000 x g, 2 min), washed twice with 200 μ l PBS-T and the pellet was resuspended in 10 μ l PBS-T buffer for fluorescence microscopy. Binding assays were also carried out with cells in the log (OD₆₀₀ 1) or stationary (OD₆₀₀ 2-3) phase, and with cells that had been boiled (100°C for 10 min) or treated with

lysozyme (1 mg/ml, 37°C, 3.5 h). Samples were viewed with a Nikon Eclipse 50i microscope equipped with a LED illumination unit pE-300^{white}, DS Camera Head DS-Fi1 and NIS-Elements 2.34x version imaging software. Fluorescence was excited with an LED light with excitation and emission filters for GFP detection (495 and 530 nm).

The spectrum of binding activity of GFP-CTP1L, GFP-EAD and GFP-CBD was tested at the optimal binding conditions (37°C, 20 min in PBS-T buffer) with different *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* and *C. butyricum* strains, lactic acid bacteria and frozen spore stocks. Binding assays with GFP-CBD_D215A, GFP-CBD_T221R, GFP-CBD_M263R, GFP-CTP1L_D215A and GFP-RBSKO mutants were carried out only with *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 with optimal binding conditions. To examine free CBD addition, GFP-labelled proteins were mixed with CBD-His (Dunne *et al.*, 2016) at a molar ratio of 1:10 prior to binding.

Detection of C. tyrobutyricum labelled with GFP-CBD within the matrix of a LBD cheese

An 8 month-old cheese made with milk artificially contaminated with 1×10^5 spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 /ml and showing LBD symptoms was used for the detection of *Clostridium* directly in a cheese matrix. A cheese made with the same starter culture but without clostridial spores served as control. The method of Fernández de Palencia *et al.* (Fernandez de Palencia *et al.*, 2004) was followed with some modifications. Briefly, cheese (0.4 g) was homogenised with 1 ml PBS buffer (pH 8), incubated for 5 min at 30°C, centrifuged (6,000 x g, 10 min) and washed twice in PBS buffer. Then, the protocol followed for binding assays was similar to that described above - approximately 50 µl of the cheese sample was mixed with the GFP-linker control or with GFP-CBD to a final concentration of 3.0 µM protein, incubated at 37°C for 20 min and washed twice with PBS buffer. Finally, a small piece of cheese sample was spread along a glass slide for fluorescence microscopy. Lactate fermenting *Clostridium* spores were enumerated from homogenized cheese samples (10 g) as described previously (Garde *et al.*, 2011).

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from project RTA 2011-00024-C02-01 and RTA2015-00018-C03-01 (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, NGT, MA and SG) and an INIA grant (NGT), and from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) Institute Strategic Programme grant BB/J004529/1 (MJM and AN). We are also grateful to Dr Nathalie Juge (IFR) for providing *Lactobacillus reuteri* 1063N and Dr Philip Hill (University of Nottingham) for the provision of GFP. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bai, J., Kim, Y. T., Ryu, S. & Lee, J. H. (2016) Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in microbiology* **7**: 474.
- Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S. & Cocconcelli, P. S. (2013) TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *Int Dairy J* **33**: 75-82.
- Bonaiti, C., Parayre, S. & Irlinger, F. (2006) Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *Int J Food Microbiol* **107**: 171-179.
- Brandle, J., Domig, K. J. & Kneifel, W. (2016) Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control* **67**: 96-113.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. & Comi, G. (2004) The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *Int J Food Microbiol* **90**: 83-91.
- Dunne, M., Leicht, S., Krichel, B., Mertens, H. D., Thompson, A., Krijgsveld, J. *et al.* (2016) Crystal structure of the CTP1L endolysin reveals how its activity is regulated by a secondary translation product. *J Biol Chem* **291**: 4882-4893.
- Dunne, M., Mertens, H. D., Garefalaki, V., Jeffries, C. M., Thompson, A., Lemke, E. A. *et al.* (2014) The CD27L and CTP1L endolysins targeting Clostridia contain a built-in trigger and release factor. *PLoS pathogens* **10**: e1004228.
- Dunne, M. S. (2014) A novel activation mechanism for Clostridial bacteriophage endolysins. College of Science, Engineering and Food Science. Ireland, University College Cork. **PhD**.
- Fernandez de Palencia, P., de la Plaza, M., Mohedano, M. L., Martinez-Cuesta, M. C., Requena, T., Lopez, P. & Pelaez, C. (2004) Enhancement of 2-methylbutanal formation in cheese by using a fluorescently tagged Lacticin 3147 producing *Lactococcus lactis* strain. *Int J Food Microbiol* **93**: 335-347.
- Fischetti, V. A. (2010) Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol* **300**: 357-362.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P. & Nunez, M. (2011) Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates. *Int Dairy J* **21**: 272-278.
- Garde, S., Avila, M., Gomez, N. & Nunez, M. (2013). *Clostridium* in late blowing defect of cheese: detection, prevalence, effects and control strategies. In Cheese: Production, Chemistry and Sensory Properties, 503-518. Edited by H. Castelli, du Vale, L. New York: Nova Science Publishers.
- Garde, S., Gaya, P., Arias, R. & Nunez, M. (2012) Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of *Clostridium* spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. *Food Control* **28**: 392-399.
- Gerova, M., Halgasova, N., Ugorcakova, J. & Bukovska, G. (2011) Endolysin of bacteriophage BFK20: evidence of a catalytic and a cell wall binding domain. *Fems Microbiol Lett* **321**: 83-91.
- Gomez-Torres, N., Garde, S., Peiroten, A. & Avila, M. (2015) Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control* **56**: 186-194.
- Gu, J., Lu, R., Liu, X., Han, W., Lei, L., Gao, Y. *et al.* (2011) LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci. *Current microbiology* **63**: 538-542.
- Gutierrez, D., Rodriguez-Rubio, L., Martinez, B., Rodriguez, A. & Garcia, P. (2016) Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology* **7**: 825.

- Hendrix, R. W. (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical population biology* **61**: 471-480.
- Herman, L., DeBlock, J. & VanRenterghem, R. (1997) Isolation and detection of *Clostridium tyrobutyricum* cells in semi-soft and hard cheeses using the polymerase chain reaction. *J Dairy Res* **64**: 311-314.
- Herman, L. M., De Block, J. H. & Waes, G. M. (1995) A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Appl Environ Microbiol* **61**: 4141-4146.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**: 61-68.
- Hu, S., Kong, J., Kong, W., Guo, T. & Ji, M. (2010) Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Micro* **76**: 2410-2418.
- Klijn, N., Nieuwenhof, F. F., Hoolwerf, J. D., van der Waals, C. B. & Weerkamp, A. H. (1995) Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2919-2924.
- Kong, M. & Ryu, S. (2016) Identification of a bacteria-specific binding protein from the sequenced bacterial genome. *Journal of microbiology and biotechnology* **26**: 38-43.
- Kretzer, J. W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K. P., Korn, C. & Loessner, M. J. (2007) Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Appl Environ Micro* **73**: 1992-2000.
- Lavilla, M., Moros, M., Puertas, S., Grazu, V., Perez, M. D., Calvo, M. *et al.* (2012) Specific peptides as alternative to antibody ligands for biomagnetic separation of *Clostridium tyrobutyricum* spores. *Anal Bioanal Chem* **402**: 3219-3226.
- Le Bourhis, A. G., Dore, J., Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R. & Tholozan, J. L. (2007) Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *Int J Food Microbiol* **113**: 154-163.
- Le Bourhis, A. G., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J. P., Chamba, J. F., Popoff, M. R. & Tholozan, J. L. (2005) Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 29-38.
- Leuschner, R. G. K., Weaver, A. C. & Lillford, P. J. (1999) Rapid particle size distribution analysis of *Bacillus* spore suspensions. *Colloid Surface B* **13**: 47-57.
- Loessner, M. J. (2005) Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol* **8**: 480-487.
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F. & Scherer, S. (2002) C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol* **44**: 335-349.
- Low, L. Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. & Liddington, R. C. (2005) Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *J Biol Chem* **280**: 35433-35439.
- Mackenzie, D. A., Jeffers, F., Parker, M. L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R. J., Roos, S. *et al.* (2010) Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* **156**: 3368-3378.
- Mayer, M. J., Garefalaki, V., Spoerl, R., Narbad, A. & Meijers, R. (2011) Structure-based modification of a *Clostridium difficile*-targeting endolysin affects activity and host range. *Journal of bacteriology* **193**: 5477-5486.

- Mayer, M. J., Gasson, M. J. & Narbad, A. (2012) Genomic sequence of bacteriophage ATCC 8074-B1 and activity of its endolysin and engineered variants against *Clostridium sporogenes*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3685-3692.
- Mayer, M. J., Narbad, A. & Gasson, M. J. (2008) Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin. *Journal of bacteriology* **190**: 6734-6740.
- Mayer, M. J., Payne, J., Gasson, M. J. & Narbad, A. (2010) Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5415-5422.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T., Castiglioni, B. & Brasca, M. (2015) Development of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sporogenes* and *Clostridium tyrobutyricum* in milk. *Anaerobe* **34**: 44-49.
- Na, H., Kong, M. & Ryu, S. (2016) Characterization of LysPBC4, a novel *Bacillus cereus*-specific endolysin of bacteriophage PBC4. *Fems Microbiol Lett* **363**.
- Nakoneczna, A., Cooper, C. J. & Gryko, R. (2015) Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *Journal of applied microbiology* **119**: 620-631.
- Paskaleva, E. E., Mundra, R. V., Mehta, K. K., Pangule, R. C., Wu, X., Glatfelter, W. S. *et al.* (2015) Binding domains of *Bacillus anthracis* phage endolysins recognize cell culture age-related features on the bacterial surface. *Biotechnology progress* **31**: 1487-1493.
- Porter, C. J., Schuch, R., Pelzek, A. J., Buckle, A. M., McGowan, S., Wilce, M. C. *et al.* (2007) The 1.6 Å crystal structure of the catalytic domain of PlyB, a bacteriophage lysin active against *Bacillus anthracis*. *J Mol Biol* **366**: 540-550.
- Rodriguez-Rubio, L., Gutierrez, D., Donovan, D. M., Martinez, B., Rodriguez, A. & Garcia, P. (2016) Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical reviews in biotechnology* **36**: 542-552.
- Sanz, J. M., Diaz, E. & Garcia, J. L. (1992) Studies on the structure and function of the N-terminal domain of the pneumococcal murein hydrolases. *Mol Microbiol* **6**: 921-931.
- Schmelcher, M., Donovan, D. M. & Loessner, M. J. (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future microbiology* **7**: 1147-1171.
- Schmelcher, M. & Loessner, M. J. (2016) Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current opinion in biotechnology* **37**: 76-87.
- Schmelcher, M., Shabarova, T., Eugster, M. R., Eichenseher, F., Tchang, V. S., Banz, M. & Loessner, M. J. (2010) Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5745-5756.
- Schmelcher, M., Tchang, V. S. & Loessner, M. J. (2011) Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microbial biotechnology* **4**: 651-662.
- Sugahara, K., Yokoi, K. J., Nakamura, Y., Nishino, T., Yamakawa, A., Taketo, A. & Kodaira, K. (2007) Mutational and biochemical analyses of the endolysin Lys(gaY) encoded by the *Lactobacillus gasseri* JCM 1131T phage phi gaY. *Gene* **404**: 41-52.
- Walcher, G., Stessl, B., Wagner, M., Eichenseher, F., Loessner, M. J. & Hein, I. (2010) Evaluation of paramagnetic beads coated with recombinant *Listeria* phage endolysin-derived cell-wall-binding domain proteins for separation of *Listeria monocytogenes* from raw milk in combination with culture-based and real-time polymerase chain reaction-based quantification. *Foodborne Pathog Dis* **7**: 1019-1024.
- Ward, W. W. & Bokman, S. H. (1982) Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* **21**: 4535-4540.

- Wilson, I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3741-3751.
- Yang, H., Wang, D. B., Dong, Q., Zhang, Z., Cui, Z., Deng, J. *et al.* (2012) Existence of separate domains in lysin PlyG for recognizing *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**: 5031-5039.
- Yang, W. W., Crow-Willard, E. N. & Ponce, A. (2009) Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. *Journal of applied microbiology* **106**: 27-33.
- Yu, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, H., Yang, H. & Wei, H. (2016) Sensitive and rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk via cell binding domain of lysin. *Biosensors & bioelectronics* **77**: 366-371.

Table 1 Binding of GFP-endolysins to *Clostridium* strains^a

<i>Clostridium</i> strains	GFP-CTP1L	GFP-EAD	GFP-CBD
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 9582	+++	-	+++
<i>C. tyrobutyricum</i> CECT 4011*	++	-	+++
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 68*	++	-	++
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 69	+	-	++
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 78	+	-	+
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 79	+	-	+
<i>C. sporogenes</i> ATCC 17886	+	-	+
<i>C. sporogenes</i> CECT 892	++	-	++
<i>C. sporogenes</i> INIA 71*	+	-	+
<i>C. beijerinckii</i> LMG 5716	-	-	++
<i>C. beijerinckii</i> INIA 73	-	-	+++
<i>C. beijerinckii</i> INIA 72	+++	-	++
<i>C. beijerinckii</i> INIA 63*	++	-	++
<i>C. beijerinckii</i> INIA 65	-	-	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 74	-	-	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 75	++	-	++
<i>C. beijerinckii</i> INIA 76	+++	-	+++
<i>C. beijerinckii</i> INIA 77	+++		+++
<i>C. butyricum</i> CECT 361	++	-	++
<i>C. butyricum</i> INIA 66	-	-	-

^a +, low binding; ++, binding; +++, strong binding; -, no binding; *, strains shown to cause LBD (Gómez-Torres *et al.*, 2015).

Table 2 Binding of GFP-endolysins to lactic acid bacteria and *Clostridium* spores^a

Binding target	GFP-CTP1L	GFP-CBD
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> INIA 415	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCIMB 700176	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> FI10734	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> FI10735	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i> 1063N	-	-
Choozit TM MA 11	-	-
Choozit TM TA 54	-	-
FD-DVS FLORA DÁNICA	-	-
RSF 636	-	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 77 spores	+	+
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 9582 spores	+	+
<i>C. tyrobutyricum</i> CECT 4011 spores	+	+
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 68 spores	+	+
<i>C. beijerinckii</i> INIA 75 spores	+	+
<i>C. butyricum</i> CECT 361 spores	+	+
<i>C. sporogenes</i> CECT 892 spores	+	+

^a +, binding; -, no binding.

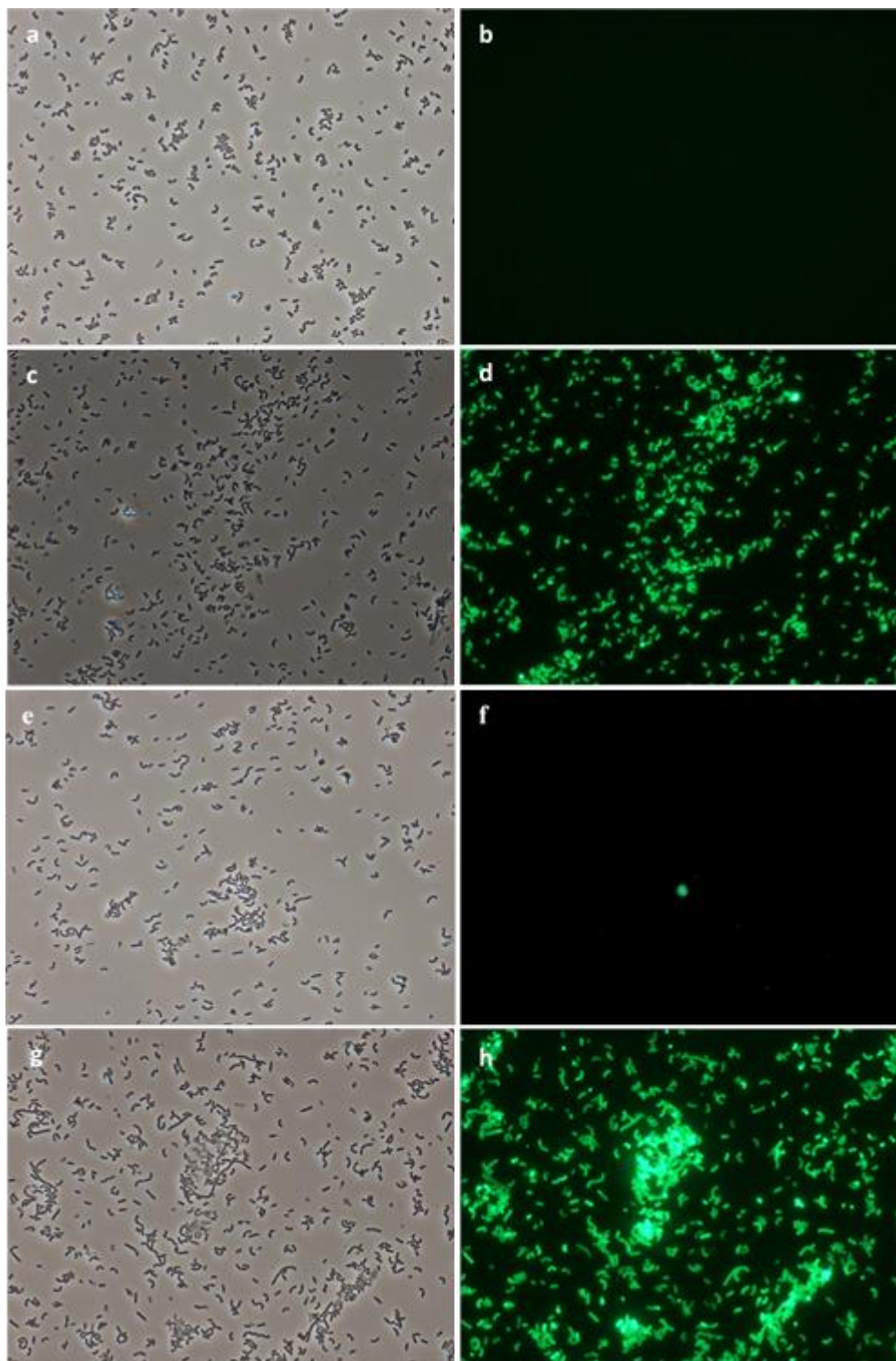


Fig. 2 Cells of *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 after incubation with GFP-labelled proteins at standard conditions of binding (37°C, 20 min in PBS-T buffer). Pictures were taken with phase contrast (left) and green fluorescence (right) at a magnification of x400.

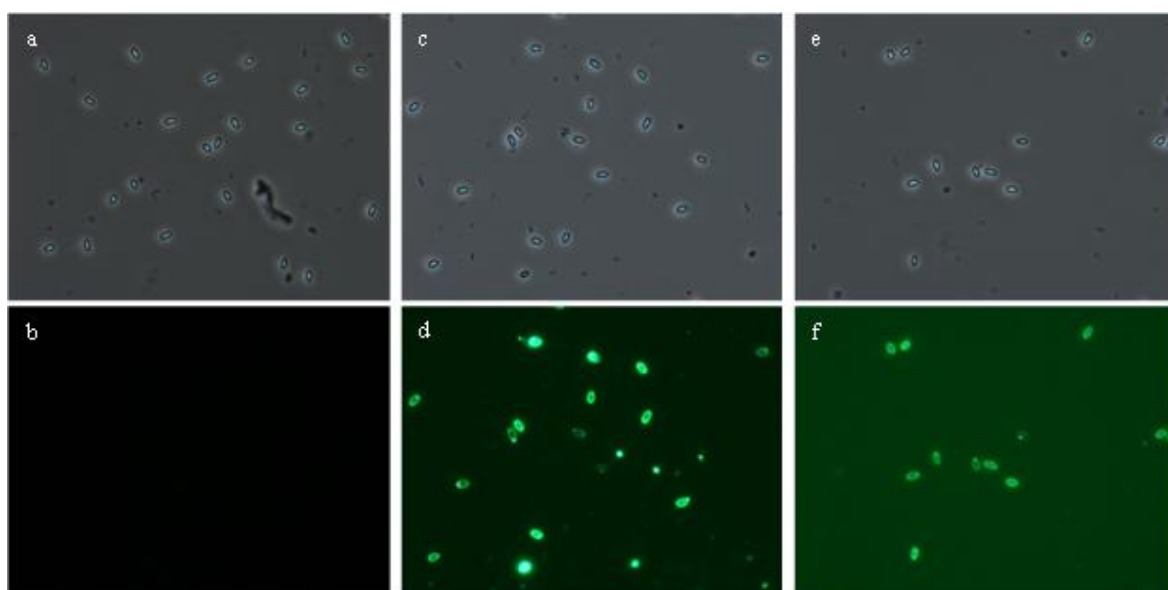


Fig. 3 Fluorescent labelling of *C. beijerinckii* INIA 77 spores. Pictures were taken with phase contrast (top) and green fluorescence (bottom) at a magnification of x1000.

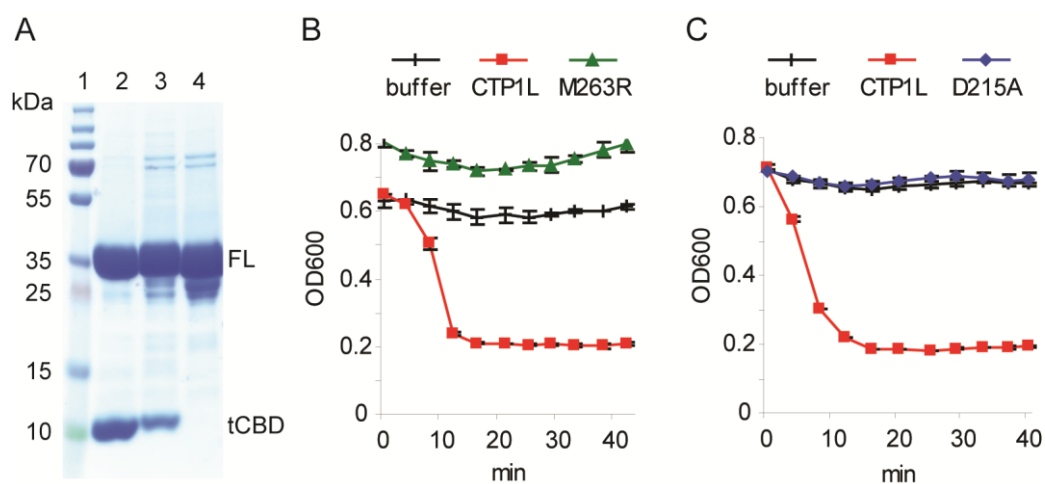


Fig. 4 Effect of site directed mutations on oligomerisation and lytic activity. A) SDS-PAGE of Ni-NTA-purified endolysins showing co-purification of tCBD, lane 1, Marker, lane 2, wild type CTP1L, lane 3, mutant CTP1L-M263R, lane 4, mutant CTP1L-D215A, FL, full length endolysin, tCBD, co-purified free CBD domain; B) lytic activity of CTP1L-M263R; C) lytic activity of CTP1L-D215A. Results are the mean of duplicate assays \pm standard deviation.

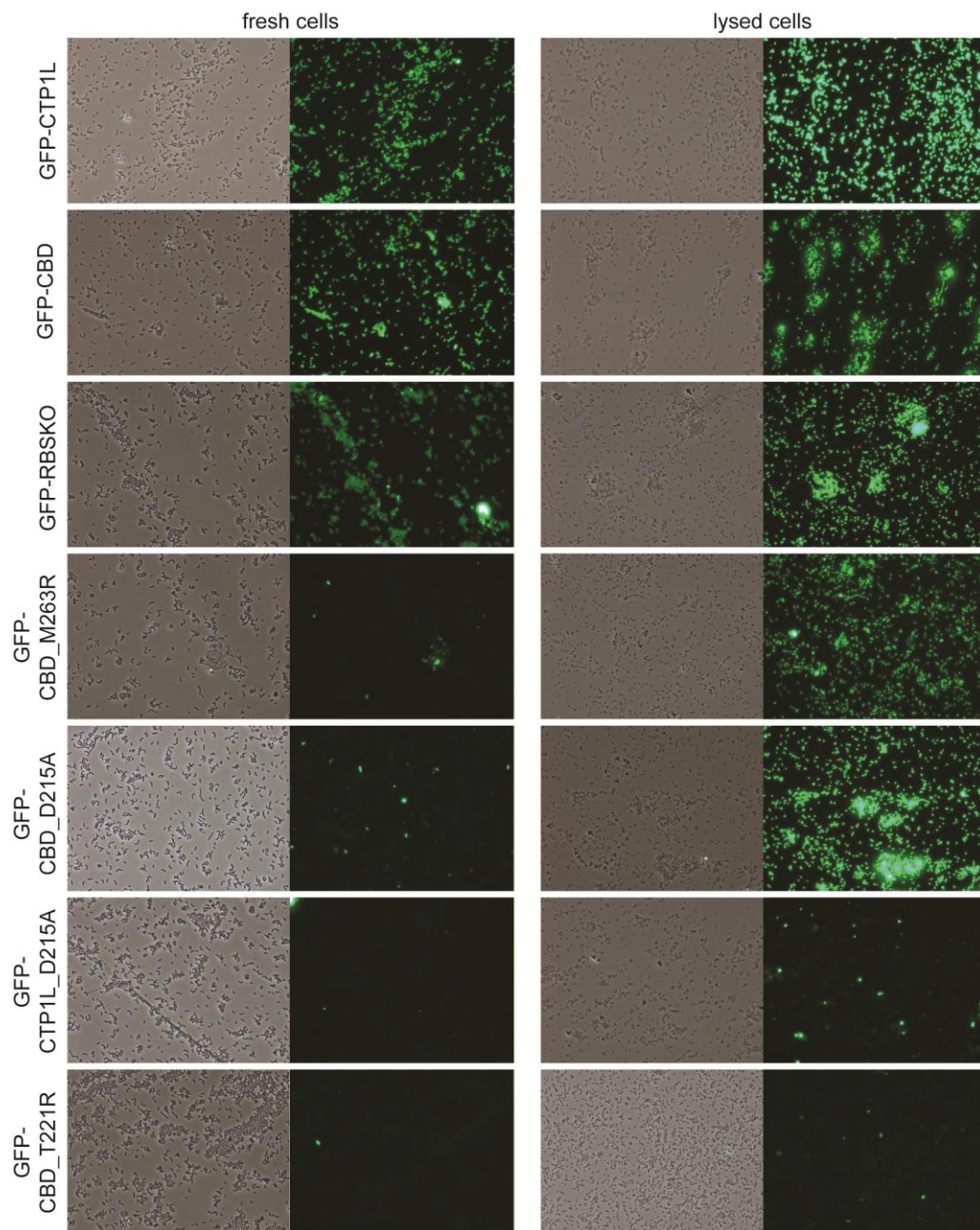


Fig. 5 Impact of site directed mutations on binding to *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 fresh (left column) or lysozyme-treated (right column) cells. Pictures were taken with phase contrast and green fluorescence at a magnification of x400.

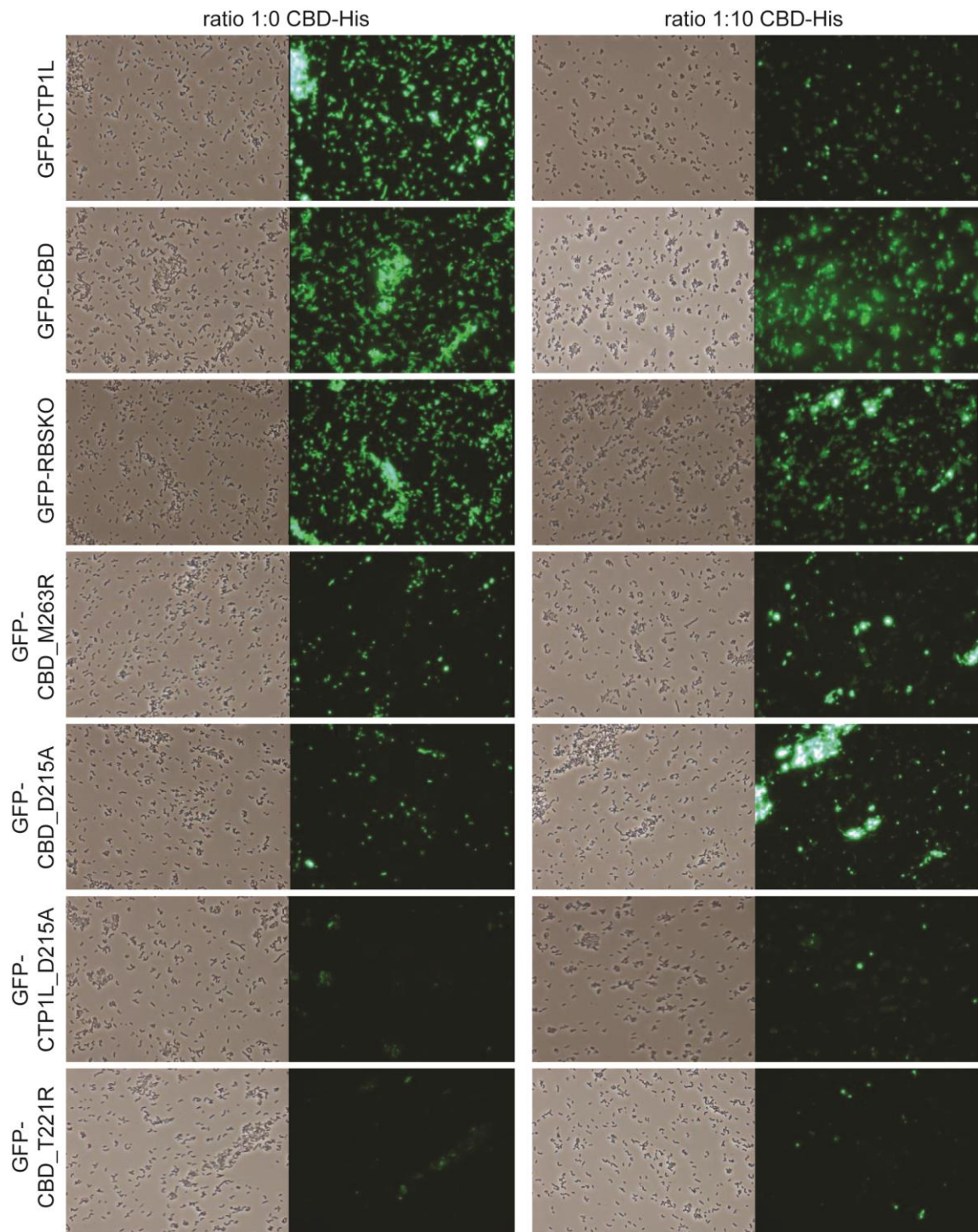


Fig. 6 Fluorescence microscopy images of binding of wild type and mutant GFP-endolysins to *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 with (right column) and without (left column) addition of free CBD-His. Pictures were taken with phase contrast and green fluorescence at a magnification of x400.

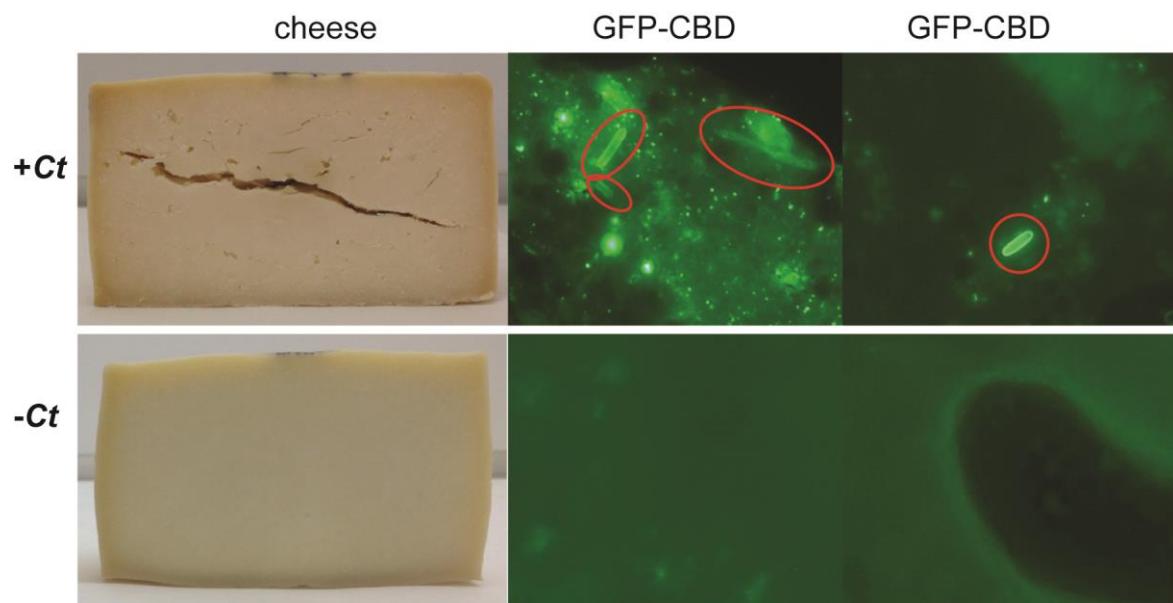


Fig. 7 Detection of *C. tyrobutyricum* in a cheese matrix. Images of cheeses and fluorescent cells detected by GFP-CBD in cheese with (top) or without (bottom) inoculation with *C. tyrobutyricum* INIA 68. *C. tyrobutyricum* cells are encircled; microscopy images were taken at a magnification of x1000.

Table S1 Specific primers pairs used for splice overlap extension PCR, site-directed mutagenesis and analysis of CTP1L constructs^a

Primer	Nucleotide sequences
M263R_F	5'-GCTCAACAAGGTACACA ACTAGGCAGGCAGTACT -3'
M263R_R	5'-CGAGTTGTTCCATGTGTTGATCCGTC CGTCATGA -3'
GFPspliceCTP1L_R	5'- <u>TCTGCTATTTTCTTCATTCCACTACCTGATCC</u> -3'
CTP1LspliceGFP_F	5'-TGGATCAGGTAGTGGA ATGGAAAATTTAGTAGTTTAT -3'
pET15b_F	5'-CATCATCATCACAGCAGCG-3'
pET15b_R	5'-GCAGCCAACTCAGCTTCC-3'
D215A_F	5'-TTAGCAGCTAGATTGGCATGT-3'
D215A_R	5'-GCCAATCTAGCTGCTAAATATTCT-3'
T221R_F	5'-CATGTCCACGTATTAACAATG-3'
T221R_R	5'-TGTTAATACGTGGACATGCCAAT-3'
M263_F	5'-CACAACTAGGCAGGCAGTACTT-3'
M263_R	5'-CTGCCTGCCTAGTTGTGTACCT-3'
SSspliceCTP1L_R	5'-TTCCACTTCATCTTCAGAAGAAATATATTTTATAAAATTC-3'
CTP1LspliceSS_F	5'-TAAAATATATTTCTTCTGAAGATGAAGTGGAAAAT-3'
T7P2_F	5'-TGAGCGGATAACAATTCCC-3'
T7T_R	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

^a Overlap sequences are underline and start site is bold.

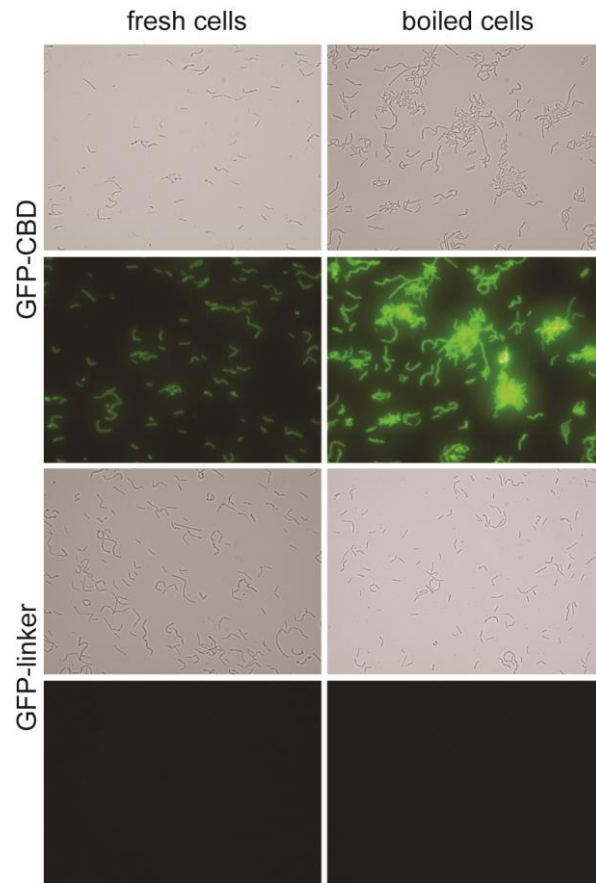


Fig. S1 Increase in binding of GFP-CBD to boiled cells. Microscopy images were taken at a magnification of x400 and at equivalent exposures.

Use of fluorescent CTP1L endolysin cell wall-binding domain to study the evolution of *Clostridium tyrobutyricum* during cheese ripening

Natalia Gómez-Torres^a, Marta Ávila^a, Arjan Narbad^b, Melinda J. Mayer^b, Sonia Garde^{a*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

^b Gut Health and Food Safety Institute Strategic Programme, Institute of Food Research, Colney, Norwich, UK, NR4 7UA

* Corresponding author

E-mail address: sgarde@inia.es

ABSTRACT

Clostridium tyrobutyricum is a bacteria of concern in the cheese industry, capable of surviving the manufacturing process and cause butyric acid fermentation and late blowing defect (LBD) of cheese. In this work, we implement a method based on the cell wall-binding domain (CBD) of CTP1L endolysin to detect *C. tyrobutyricum* involved in LBD and discern its evolution during 3-month ripening of cheeses inoculated with clostridial spores and with or without reuterin as anti-clostridial agent. For this purpose, total bacteria were extracted from cheese samples and *C. tyrobutyricum* cells were specifically stained with the CBD of CTP1L attached to GFP, and detected by fluorescence microscopy. By using the GFP-CBD, germinated spores were visualized on day 1 in all cheeses made with them. Vegetative cells of *C. tyrobutyricum*, responsible for butyric acid fermentation, were detected in those cheeses without reuterin from 30 d onwards, and LBD symptoms became concomitantly evident at that time. The number of fluorescent *Clostridium* cells increased over ripening in the blowing cheeses. However, vegetative cells of *C. tyrobutyricum* were not detected in cheese with the antimicrobial reuterin, which did not show LBD throughout ripening. This simply and fast method results a helpful tool to study the evolution of *C. tyrobutyricum* during cheese ripening.

Keywords:

Clostridium tyrobutyricum

Late blowing defect

Cheese

Detection

Endolysin

GFP-Cell wall binding domain

1. Introduction

Clostridium tyrobutyricum, a gram-positive, anaerobic, spore-forming bacterium, is considered the principal responsible for the late blowing defect (LBD) of cheese, which generates severe economic losses at the cheese industry. This bacterium is capable of fermenting lactic acid with the production of butyric and acetic acids and gases such as carbon dioxide and hydrogen. The pressure of accumulated gases causes cracks and splits resulting in the appearance of texture and flavour defect during the ripening, which are generally accompanied by unpleasant aroma and rancid flavour (Garde et al., 2013).

Traditional methods for detection of *Clostridium* in cheese are based on the determination of spore counts by heat treatment of cheese samples to destroy vegetative cells, followed by a most probable number (MPN) enumeration, based on gas production after growing in an appropriate medium with lactate as carbon and electron source, and incubating for a long period. As these techniques are laborious, time-consuming, and fail to differentiate among *Clostridium* spp. and even among spore-forming bacteria, methods based on PCR techniques have been proposed to detect dairy-related *Clostridium* spp. directly in cheese, without previous strain isolation (Bassi et al., 2015; Cocolin et al., 2004; Klijn et al., 1995; Le Bourhis et al., 2005). However, these methods may have other problems such as a low DNA extraction efficiency due to the interference of cheese components with chemical reagents necessary to DNA extraction, and/or a low PCR sensitivity as consequence of an insufficient elimination of these chemical reagents, many of which are PCR inhibitors (Bonaïti et al., 2006).

An innovative strategy to detect specifically *Clostridium* spp. cells has been studied by harnessing the properties of high-affinity cell wall-binding domains (CBDs) of bacteriophage endolysins (Gómez-Torres et al., under review; Mayer et al., 2011). Endolysins are highly evolved enzymes encoded in bacteriophage genomes which are used to digest the bacterial cell wall ‘from within’ at the terminal stage of the phage multiplication cycle (Loessner, 2005). They show a modular organisation of at least two distinct functional domains: an N-terminal enzymatically active domain, which catalyse bacteria cell wall breakdown, and a C-terminal CBD responsible for high cell wall specificity of the enzyme, targeting the protein to the ligands present in or on the bacterial cell wall (Loessner, 2005). Numerous studies have demonstrated the potential of bacteriophage endolysins for the control and detection of food-borne pathogens and spoilage bacteria; however, very few studies actually investigate its use as detection system in food products (Schmelcher and Loessner 2016). The CBD-based magnetic separation procedure was evaluated for capture and detection of *L. monocytogenes* from artificially and naturally contaminated food samples (Kretzer et al., 2007; Schmelcher et al., 2010). Other techniques based on the high specificity and binding affinity of CBDs have been their use in enzyme linked immunosorbent

assay for detecting *Staphylococcus aureus* in milk (Yu et al., 2015), and their use in surface plasmon resonance method for detecting *Bacillus cereus* (Kong et al., 2015).

In a previous study, we described the great ability of the CBD of CTP1L endolysin that targets *C. tyrobutyricum* (Mayer et al., 2010) attached to fluorescent GFP (GFP-CBD) to bind to vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* spp. (Gómez-Torres et al., under review). In addition, *C. tyrobutyricum* cells were specifically labelled directly with GFP-CBD into the matrix of a LBD cheese. In this work, we have i) improved the labelling protocol and ii) implemented the new protocol to monitor the evolution of *Clostridium* during ripening of a semi-hard ewe milk cheese made with spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 and with or without reuterin as anti-clostridial agent. Reuterin was produced in cheese by using reuterin-producing *L. reuteri* INIA P572 as adjunct coupled with glycerol (substrate for reuterin production).

2. Materials and Methods

2.1. Cheese samples

Cheeses were made as described previously by Ávila et al. (2017). Briefly, pasteurized ewe milk was distributed in four vats, each containing 50 L of milk. Commercial freeze-dried mesophilic lactic culture ChoozitTM MA 11 from Danisco (Laboratorios Arroyo, Santander, Spain), consisting of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* strains, was added to all vats (approximately 7 log cfu/ml milk). Spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 were inoculated in vats 2, 3 and 4 (approximately 5 log spores/ml milk) to cause LBD. *L. reuteri* INIA P572 was added at 0.1% (approximately 6 log cfu/ml milk) to vats 3 and 4, and food-grade glycerol (> 99%, FCC, FG, Sigma-Aldrich) to vat 4 (30 mM final concentration) to promote reuterin synthesis by *L. reuteri*. Cheeses were ripened at 12 °C and 85% HR for 90 d. One cheese of approximately 1 kg (for 1 d analyses) and three cheeses of approximately 3 kg (for 30, 60 and 90 d analyses) were obtained from each vat.

2.2. Extraction of cheese microbiota

In order to improve our previous protocol for detecting *Clostridium* into the cheese matrix by means of GFP-CBD (Gómez-Torres et al. writing), a new step that consisted in a previous extraction of cheese microbiota was included. In brief, 5 g of cheese sample were homogenised with 10 ml of PBS (pH 7.4) at 40 °C in a Stomacher 400 (A. J. Seward Ltd, UK). Then, 1 ml of each homogenate was centrifuged at 100 x g for 3 min at 4 °C to precipitate cheese solids and the supernatant was recovered and centrifuged at 6000 x g for 5 min at 4 °C. After removing the cheese fat with a swab and discarding the supernatant, the pellet was resuspended in 100 µl of PBS buffer (pH 7.4). This suspension, containing bacterial cells, was used for GFP-CBD binding assay.

2.3. Detection of *C. tyrobutyricum* and other bacteria belonging to cheese microbiota

For the detection of *C. tyrobutyricum* cells in cheese, we produced recombinant GFP-CBD of CTP1L endolysin as previously described (Gómez-Torres et al. writing). In addition, GFP_pET15b, empty vector, was also constructed to use as a negative control in binding assays. The DNA-specific dye 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) was used for the analysis of the total bacterial population of cheese. Prior to binding with GFP-CBD, 10 µl of the suspension containing cheese bacterial cells were mixed with 100 µl of DAPI solution at a concentration of 5 µg/ml for 20 min at 25 °C in dark conditions. Subsequently, the mixture was centrifuged at 6000 x g for 5 min at 4 °C and pellet was washed once with PBS buffer (pH 7.4) and resuspended in the original volume of PBS buffer. Then, these 10 µl of bacterial cells suspension were mixed with an equal volume of GFP-CBD endolysin or GFP_pET15b at a final concentration of 3.0 µM, incubated at 25 °C for 20 min and washed twice with PBS buffer. Finally, samples were viewed with a Nikon Eclipse 50i microscope equipped with contrast-phase and fluorescence, DS Camera Head DS-Fi1 and NIS-Elements 2.34x version imaging software. Fluorescence was excited selecting the appropriate excitation and emission filters for GFP detection (495 and 530 nm) and DAPI staining (364 and 454 nm).

2.4. Microbiological and chemical analysis of cheeses

Lactococci, lactobacilli and spore counts of cheese samples were determined by the plate count method as described by Ávila et al. (2017). Determinations of reuterin and butyric acid were carried out as described by Gómez-Torres et al. (2014).

3. Results and discussion

3.1. Evolution of the microbiota during cheese ripening by means of phase contrast and fluorescence microscopy

In a previous work, we showed that GFP-CBD of CTP1L was able to specifically bind to the vegetative cells of *Clostridium* into the matrix of an 8 month-old LBD cheese made with milk artificially contaminated with spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 (Gómez-Torres et al., under review). However, cheese solids prevented the observation of bacterial cells by phase contrast microscopy and hindered fluorescent cell detection by fluorescence microscopy. In this work, we improved our protocol introducing a preceding step that consisted in a simple extraction of total bacterial population from cheese samples as described in Materials and Methods section. As can be seen in Fig. 1, the new protocol allowed us visualised cheese bacteria by phase contrast and fluorescence microscopy.

Fig. 1 shows phase contrast and fluorescence microscopy micrographs of the evolution of the microbiota of cheese made with mesophilic starter and spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 during

90 d of ripening after DAPI staining of total bacteria population (blue cells) and specific GFP-CBD labelling of *C. tyrobutyricum* (green cells). On day 1, coccus-shaped bacteria, belonging to starter lactococci, were detected in cheese by phase contrast and DAPI staining, but *C. tyrobutyricum* vegetative cells stained with GFP-CBD were not observed. However, upon detailed observation of several microscope fields (10-15) we were able to detect some germinated spores of *C. tyrobutyricum* (Fig. 2). After 30 d of ripening, phase contrast micrograph shows the growth of bacilli-shaped bacteria in cheese in addition to coccus bacteria, and fluorescent micrograph made evident that these bacilli corresponded to *C. tyrobutyricum* vegetative cells. Weak or none DAPI staining was observed for *Clostridium* cells, most probably due to their lysed state (Fig. 3) which may cause the release of their DNA to cheese matrix. From 60 d onwards, only bacilli cells were observed by phase contrast and fluorescence microscopy. Strong fluorescent labelling of *Clostridium* cells with GFP-CBD was found but the intensity of DAPI staining depended on the lysed state of cells (Fig. 1 and 3).

The development of *C. tyrobutyricum* INIA 68 during ripening of the four experimental cheeses is showed in Fig. 4 by means of GFP-CBD labelling of *Clostridium* cells. As expected, *Clostridium* cells were not detected in cheese made only with mesophilic starter throughout ripening. Sparse germinated spores of *C. tyrobutyricum* were detected in all 1-d-old cheeses made with clostridial spores only after observation of several microscope fields. From 30 d onwards, clostridial vegetative cells were detected by GFP-CBD in cheese made with the starter and *C. tyrobutyricum* INIA 68 spores and in cheese made with the starter, *C. tyrobutyricum* spores and *L. reuteri*, and the number of fluorescent *Clostridium* cells increased throughout ripening time in these cheeses. However, vegetative cells of *Clostridium* were not detected during ripening of cheese made with mesophilic starter, spores of *C. tyrobutyricum*, *L. reuteri* INIA P572 and glycerol.

Contrast phase and DAPI micrographs were similar for all 1 old-day cheeses (data not shown). In cheese made with the mesophilic starter, apart from coccus bacteria, some bacilli-shaped bacteria were observed in 90-day-old cheese by phase contrast and DAPI fluorescence microscopy after searching several microscope fields (5-10) (Fig. 5). For cheese made with starter, spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 and *L. reuteri* INIA P572, contrast phase and DAPI images throughout ripening were similar to those cheese made with starter and spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 which are showed in Fig. 1 (data not shown). In addition, some bacilli-shaped bacteria were detected 1-day and 90-day-old samples of this later cheese after detailed observation of several microscope fields (5-10). In cheese made with starter, spores of *C. tyrobutyricum*, *L. reuteri* and glycerol, only lactococcal cells were visualized by contrast phase and blue fluorescence microscopy (data not shown).

3.2. Relation between the microscope study and microbiological and chemical determinations of cheese

Table 1 shows lactococci, lactobacilli and clostridial spore counts during ripening of cheeses. Lactococci achieved high counts in all cheeses at the initial stages of ripening, with means values for all cheeses of 9.61 and 8.22 log cfu/g at 1 and 30 d, respectively (Table 1). These results are well related with those obtained by phase contrast and DAPI fluorescence microscopy at 1 and 30 d (Fig. 1) where coccoid cells were prevalent. Lactococci counts in cheeses declined from 60 d onwards and they were not observed by microscopy either. The loss of lactococci viability together with the absence of coccus-shaped cells observed by microscopy suggest that lactococci lysed during the last stages of cheese ripening. At 1 and 30 d, lactobacilli counts corresponded to *L. reuteri* since they were only detected in cheeses made with this microorganism. However, from 60 d onwards, lactobacilli counts comprised *L. reuteri* and adventitious lactobacilli as they were detected in all cheeses. Lactobacilli counts higher than 7.5 log cfu/g were required to be able to detect some lactobacilli after microscopic examination of diverse fields (5-10) (Fig. 5).

Spores of *C. tyrobutyricum* were only detected in cheeses made with milk artificially contaminated with them, and spore counts were similar in these three cheeses throughout ripening (Table 1). Clostridial spores germinated into vegetative cells very early since spore counts decrease a mean of 2.60 log cfu/g from 2 h-cheese curds to 6 h-cheeses (after pressing). On the other hand, spore counts remained practically constant in all cheeses from 6 h to 90 d, suggesting that no sporulation occurred during ripening. Clostridial spores were not observed by microscopy throughout cheese ripening since spore counts were very low (lower than 3 log cfu/g). However, germinated spores of *C. tyrobutyricum* were observed by microscopy at day 1 in all cheeses made with clostridial spores, although several microscope fields (10-15) were necessary to visualize them (Fig. 4). As can be seen in Fig. 4, germinated spores are not refringent and they have an elongated shape beginning to look like vegetative cells, which indicates that spores are in the outgrowth stage of germination and thus they have lost its heat resistance. This fact matches with the decrease of spore counts (determined after heat shock at 80 °C for 20 min) recorded during cheese manufacture (Table 1). From 30 d onwards, vegetative cells of *C. tyrobutyricum* INIA 68 were observed by microscopy in cheeses made with clostridial spores, except in cheese made with spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68, *L. reuteri* INIA P572 and glycerol that was the only one in which reuterin was detected (data not shown). Reuterin is an antimicrobial compound with activity against *Clostridium* species (Ávila et al., 2014; Garde et al., 2014), and it is produced in cheese by *L. reuteri* INIA P572 in the presence of glycerol (Ávila et al., 2017). Reuterin produced by *L. reuteri* INIA P572 prevented LBD of cheese (Table 2, Fig. 3). Cheese with reuterin showed a visual aspect very similar to cheese made without spores and butyric acid was not detected in these two cheeses during ripening (Table 2). These results are in accordance with the microscope study in which

clostridial cells were not observed in these two cheeses during ripening. On the contrary, the other two cheeses made with clostridial spores showed LBD and butyric acid from 30 d onwards (Table 2, Fig. 3) according with the detection of *Clostridium* cells by microscopy (Fig. 1 and 3).

To date, attempts have been made to detect *C. tyrobutyricum* from cheeses with LBD using different qualitative PCR based methods (Cocolin et al., 2004; Klijn et al., 1995; Le Bourhis et al., 2005). In addition, a real-time quantitative PCR was applied for *C. tyrobutyricum* quantification in Grana Padano cheese with LBD (Bassi et al., 2015), with counts ranging from 0.30 to 7.50 log cfu/g. Although the present method is not quantitative, taking into account the lactococci results we estimate that *C. tyrobutyricum* may have reached counts around or even above 8 log cfu/g in cheeses with LBD. To our knowledge, this is the first time that a microscopy-based technique has been applied for the study of the development of *C. tyrobutyricum* during cheese ripening. An advantage with respect to PCR methods is that our technique allows us to visualize directly clostridial cells and to know its cellular state, and this fact helps us to understand better the behaviour of *C. tyrobutyricum* in cheese and to explain unresolved questions. For example, the lysed state of clostridial cells would explain the failure to isolate or count vegetative cells of *Clostridium* from cheeses with a high LBD degree, despite the fact that anaerobic measures were taken during sample manipulation.

4. Conclusion

We report a novel detection method for *C. tyrobutyricum* based on the high specific ability of the CBD of CTP1L endolysin to bind to clostridial cells, and its application to study the evolution of *C. tyrobutyricum* during cheese ripening in the presence or absence of an anti-clostridial agent. Results showed that it is a promising simply, selective and fast technique, and provide the basis to further development of a CBD-based sensitive and quantitative detecting method for *C. tyrobutyricum*.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from projects RTA2011-00024-C02-01 and RTA2015-00018-C03-01 (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, NGT, MA and SG) and the INIA grant of NGT and support from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) Institute Strategic Programme grant BB/J004529/1 (MJM and AN). We are also grateful to Dr Philip Hill (University of Nottingham) for the provision of GFP.

References

- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., Garde, S. 2016. Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese. Food Microbiol. 60, 165-173.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., Garde, S. 2017. Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese. Food Microbiol. 66, 104-109.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., Garde, S. 2014. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. Int. J. Food Microbiol. 172, 70-75.
- Bassi, D., Puglisi, E., Cocconcelli, P.S. 2015. Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. Food Microbiol. 52, 106-11.
- Bonaïti, C., Parayre, S., Irlinger, F. 2006. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and 11 genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. Int. J. Food Microbiol. 107, 171-179.
- Garde, S., Ávila, M., Gómez, N., Núñez, M. 2013. *Clostridium* in late blowing defect of cheese: detection, prevalence, effects and control strategy, in Castelli, H., du Vale, L. (Eds.), Handbook on Cheese: production, chemistry and sensory properties. Nova Science Publisher, New York, pp. 503-517.
- Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Ávila, M. 2014. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. Food Control 44, 22-25.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D. Garde, S. 2016. Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glicerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. Int. J. Food Microbiol. 232, 103-110.
- Gómez-Torres, N., Dunne, M., Garde, S., Meijers, R., Narbad A., Ávila, M., Mayer, M.J. 2017. Development of specific fluorescent phage endolysin for *in situ* detection of *Clostridium* species associated with cheese spoilage (under review).
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., Garde, S. 2014. Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. Food Microbiol. 42, 82-88.
- Kong, M., Sim, J., Kang, T., Nguyen, H.H., Park, H. K., Chung, B.H., Ryu, S. 2015. A novel and highly specific phage endolysin cell wall binding domain for detection of *Bacillus cereus*. Eur. Biophys. J. 44, 437-446.
- Kretzer, J.W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K.P., Korn, C., Loessner, M.J. 2007. Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1992-2000.

- Langa, S., Landete, J.M., Martín-Cabrejas, I., Rodríguez, E., Arqués, J.L., Medina, M. 2013. *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. Food Control 33, 200-206.
- Le Bourhis, A.G., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R., Tholozan, J.L. 2005. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 71, 29–38.
- Loessner, M.J. 2005. Bacteriophages endolysins – current state of research and applications. Curr. Opin. Microbiol. 8, 480-487.
- Mayer, M.J., Garefalaki, V., Spoerl, R., Narbad, A., Meijers, R. 2011. Structure-based modification of a *Clostridium difficile*-targeting endolysin affect activity and host range. J. Bacteriol. 193, 5477-5486.
- Mayer, M.J., Payne, J., Gasson, M.J., Narbad, A. 2010. Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5415-5422.
- Schmelcher, M., Loessner, M. J. 2016. Bacteriophage endolysins: applications for food safety. Curr. Opin. Biotechnol. 37, 76-87.
- Schmercher, M., Shabarova, T., Eugster, M.R., Eichenseher, F., Tchang, V.S., Banz, M., Loessner, M.J. 2010. Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5745-5756.
- Yu, J., Zhang, Y., Li, H., Yang, H., Wei, H. 2015. Sensitive and rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk via cell binding domain of lysin. Biosens. Bioelectron. 77, 366-371.

Table 1

Lactococci, lactobacilli and spore counts¹ in semi-hard ewe milk cheese made with reuterin-producing *L. reuteri* INIA P572, spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 and glycerol²

	Age	Cheeses ³			
		MS	MS+CT	MS+CT+LR	MS+CT+LR+G
Lactococci	1 d	9.65±0.05 ^{aA}	9.59±0.01 ^{aA}	9.67±0.05 ^{aA}	9.54±0.01 ^{aA}
	30 d	8.19±0.05 ^{aB}	8.12±0.08 ^{aB}	8.61±0.19 ^{bB}	7.96±0.15 ^{aB}
	60 d	7.01±0.08 ^{aC}	6.99±0.08 ^{aC}	7.01±0.05 ^{aC}	7.13±0.04 ^{aC}
	90 d	6.47±0.08 ^{bD}	6.14±0.10 ^{aD}	6.53±0.05 ^{bD}	6.52±0.02 ^{bD}
Lactobacilli	1 d	ND ^{aA}	ND ^{aA}	7.59±0.08 ^{bB}	7.32±0.12 ^{bC}
	30 d	ND ^{aA}	ND ^{aA}	6.20±0.06 ^{cA}	3.77±0.08 ^{bAB}
	60 d	7.27±0.07 ^{dB}	4.87±0.05 ^{bC}	6.96±0.05 ^{cC}	3.53±0.06 ^{aA}
	90 d	7.55±0.08 ^{bC}	4.14±0.15 ^{aB}	7.84±0.01 ^{bC}	4.06±0.11 ^{aAB}
Spore	Milk	ND ^{aA}	4.90±0.28 ^{aC}	4.98±0.02 ^{aC}	4.96±0.01 ^{aC}
	Curd (2 h)	ND ^{aA}	5.69±0.06 ^{aD}	5.73±0.03 ^{aD}	5.62±0.02 ^{aD}
	6 h	ND ^{aA}	3.18±0.01 ^{aB}	3.02±0.03 ^{aB}	3.03±0.05 ^{aB}
	1 d	ND ^{aA}	2.92±0.42 ^{aAB}	2.63±0.35 ^{aAB}	2.83±0.21 ^{aAB}
	30 d	ND ^{aA}	2.35±0.01 ^{aA}	2.45±0.09 ^{aAB}	2.38±0.06 ^{aA}
	60 d	ND ^{aA}	2.40±0.02 ^{aA}	2.43±0.18 ^{aAB}	2.42±0.06 ^{aAB}
	90 d	ND ^{aA}	2.42±0.06 ^{aA}	2.32±0.03 ^{aA}	2.52±0.19 ^{aAB}

¹Mean ± SD (n = 2) of duplicate determinations, expressed as log cfu/ml of milk or log cfu/g of curd/cheese. ND: not detected (< 1.40 log cfu/g of cheese for lactobacilli and lactococci counts and < 0.40 log cfu/ml of milk or < 0.40 log cfu/g of curd/cheese for spore counts). Means in the same row followed by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.01$). Means in the same column followed by different capital letters differ significantly ($P < 0.01$).

²Glycerol is required for reuterin production by *L. reuteri* INIA P572.

³MS: mesophilic starter, CT: *C. tyrobutyricum* INIA 68, LR: *L. reuteri* INIA P572, G: glycerol.

Table 2

Symptoms of late blowing defect (LBD) and concentration of butyric acid¹ in semi-hard ewe milk cheese made with reuterin-producing *L. reuteri* INIA P572, spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 and glycerol²

	Age (d)	Cheeses ³			
		MS	MS+CT	MS+CT+LR	MS+CT+LR+G
LBD	1	No	No	No	No
	30	No	Yes	Yes	No
	60	No	Yes	Yes	No
	90	No	Yes	Yes	No
Butyric acid	1	ND ^{aA}	ND ^{aA}	ND ^{aA}	ND ^{aA}
	30	ND ^{aA}	0.82±0.02 ^{bB}	1.13±0.02 ^{cB}	ND ^{aA}
	60	ND ^{aA}	2.65±0.02 ^{bC}	3.45±0.03 ^{cC}	ND ^{aA}
	90	ND ^{aA}	8.00±0.03 ^{bD}	8.98±0.05 ^{cD}	ND ^{aA}

¹Mean ± SD (n = 2) of duplicate determinations, expressed as mg/g of cheese dry matter. ND: not detected. Means in the same row followed by different lowercase letters differ significantly ($P < 0.01$). Means in the same column followed by different capital letters differ significantly ($P < 0.01$).

²Glycerol is required for reuterin production by *L. reuteri* INIA P572.

³MS: mesophilic starter, CT: *C. tyrobutyricum* INIA 68, LR: *L. reuteri* INIA P572, G: glycerol.

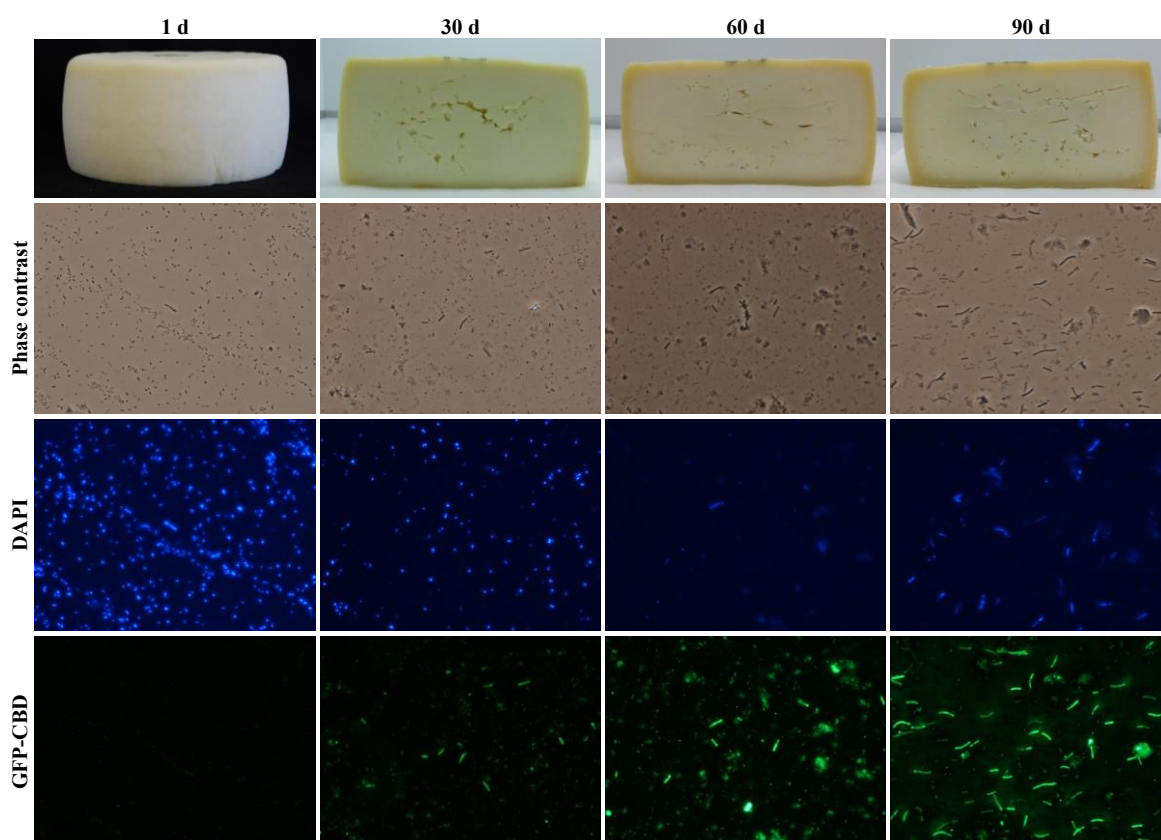


Fig. 1. Photographs of ewe milk cheese made with a mesophilic starter and spores of *Clostridium tyrobutyricum* INIA 68 showing late blowing defect from 30 d onwards, and evolution of cheese microbiota during ripening by phase contrast and fluorescence microscopy (blue fluorescence: DAPI staining of bacteria, green fluorescence: GFP-CBD labelling of *C. tyrobutyricum* cells). Magnification x 400.

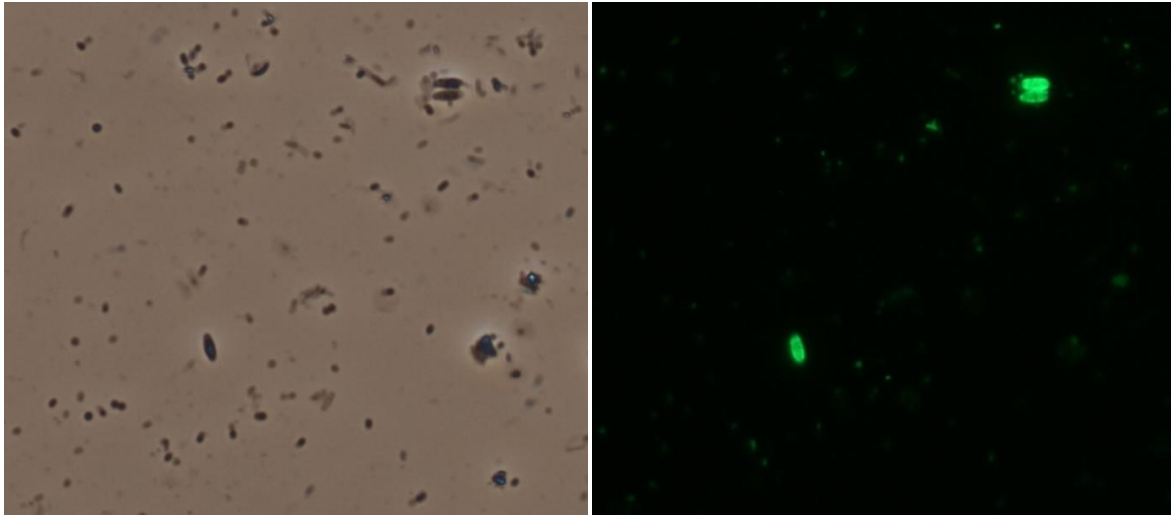


Fig. 2. Germinated spores of *Clostridium tyrobutyricum* in 1-d-old ewe milk cheese made with a mesophilic starter and spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 by phase contrast and fluorescence microscopy (green fluorescence: GFP-CBD labelling of *C. tyrobutyricum* cells). Magnification x 400.

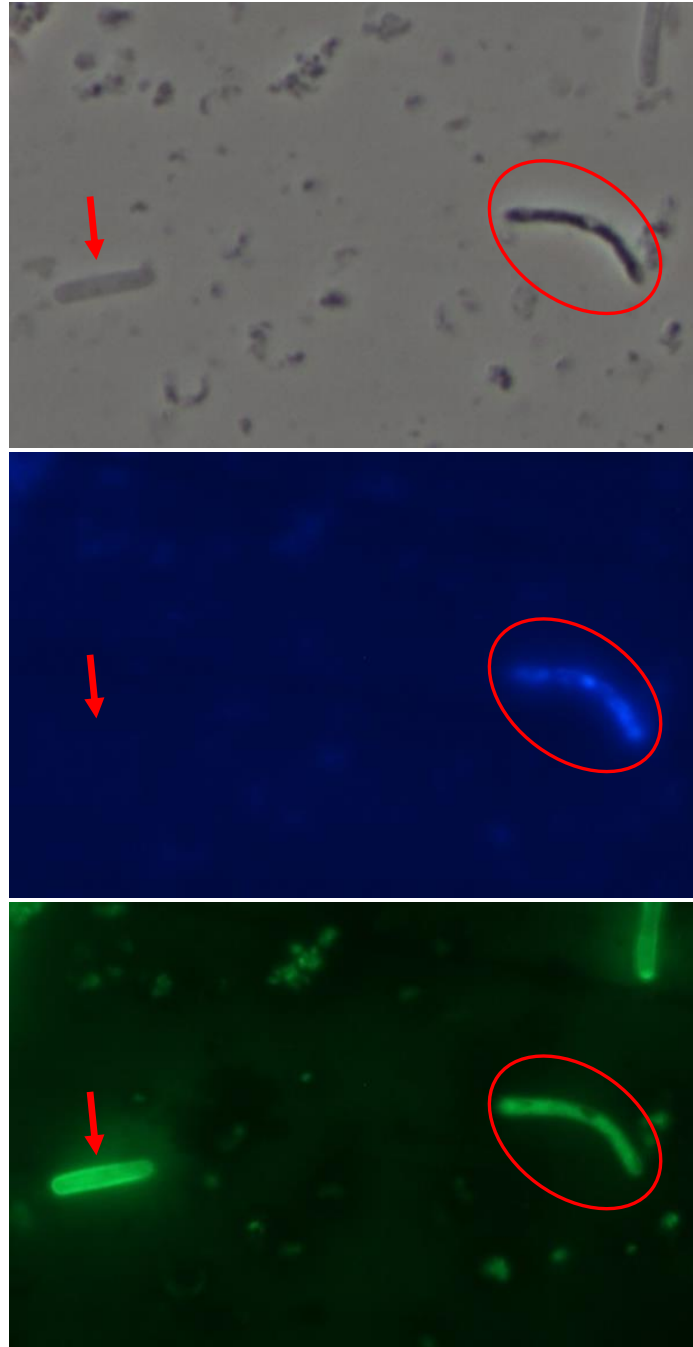


Fig. 3. Detail of *Clostridium tyrobutyricum* cells in 90-d-old ewe milk cheese made with a mesophilic starter and spores of *C. tyrobutyricum* INIA 68 by phase contrast and fluorescence microscopy (blue fluorescence: DAPI staining of bacteria, green fluorescence: GFP-CBD labelling of *C. tyrobutyricum* cells). Red arrows point lysed cell of *C. tyrobutyricum* (not stained by DAPI) and red circles point partially lysed cell of *C. tyrobutyricum*. Magnification x 1000.

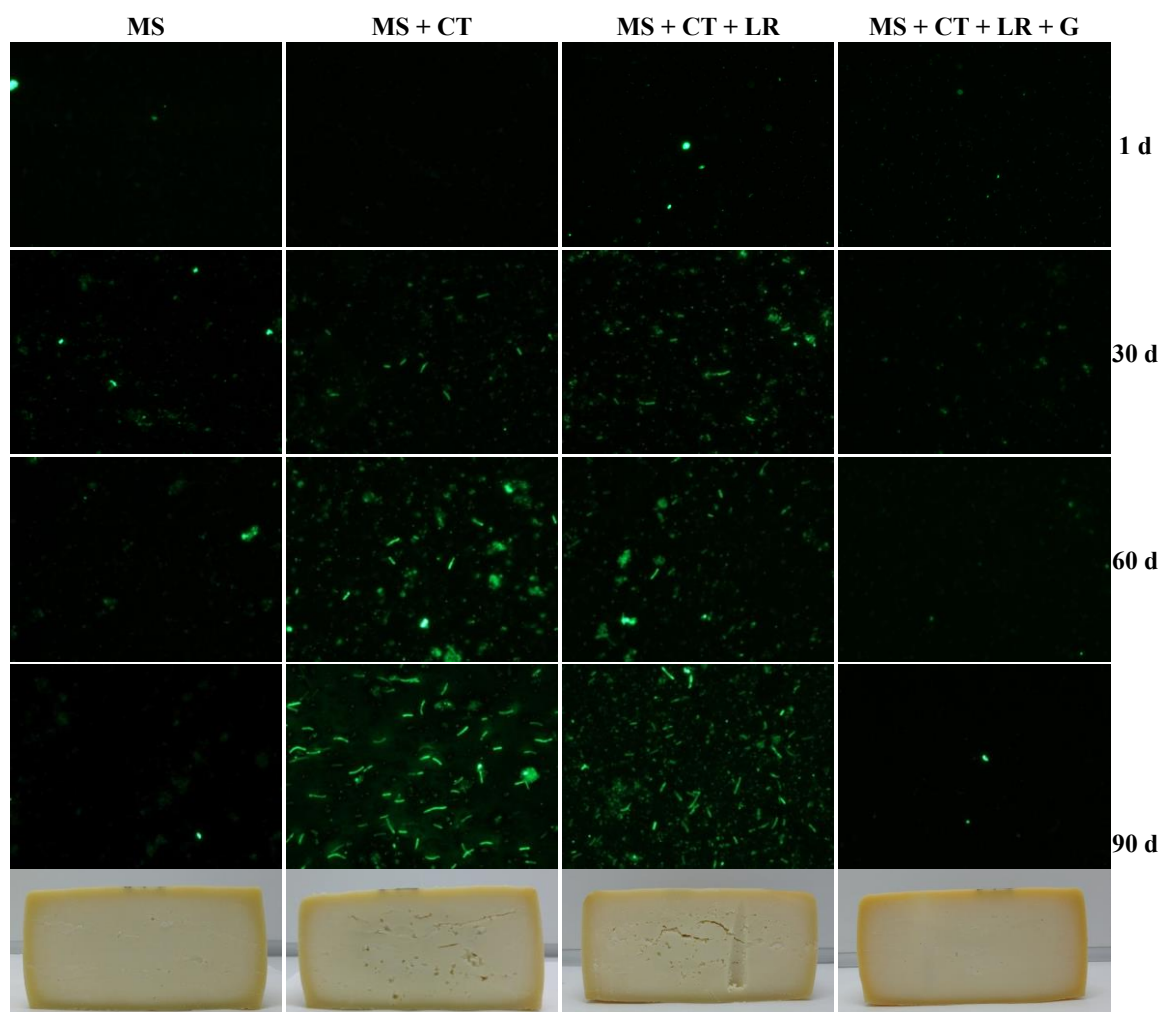


Fig. 4. Photographs of 90 d-old ewe milk cheeses made with a mesophilic starter (MS), spores of *Clostridium tyrobutyricum* INIA 68 (CT), *Lactobacillus reuteri* INIA P572 (LR) and without or with glycerol (G), and development of *C. tyrobutyricum* INIA 68 during cheese ripening by GFP green fluorescence (GFP-CBD labelling of *C. tyrobutyricum* cells). Magnification x 400.

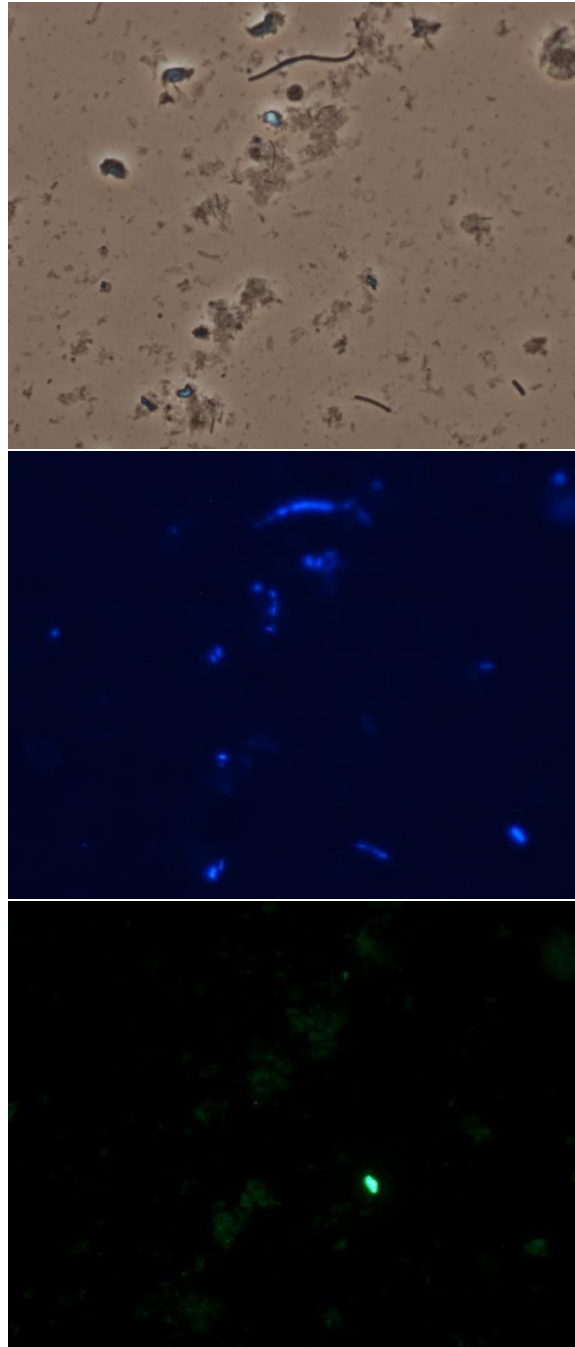


Fig. 5. Detail of lactobacilli cells in 90-d-old ewe milk cheese made with mesophilic starter by phase contrast and fluorescence microscopy (blue fluorescence: DAPI staining of bacteria, green fluorescence: GFP-CBD labelling of *C. tyrobutyricum* cells). Magnification x 400.

Tabla A5.1. Espectro de actividad lítica de la endolisina CTP1L frente a *Clostridium* spp.

Cepas de <i>Clostridium</i>	Origen ¹	Actividad lítica ²
<i>C. tyrobutyricum</i> NCIMB 9582	NCIMB	+
<i>C. tyrobutyricum</i> CECT 4011	CECT	-
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 68	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 69	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 78	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. tyrobutyricum</i> INIA 79	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. sporogenes</i> ATCC 17886	ATCC	+
<i>C. sporogenes</i> CECT 892	CECT	-
<i>C. sporogenes</i> INIA 71	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> LMG 5716	BCCM/LMG	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 63	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 65	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 72	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 73	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 74	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 75	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 76	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. beijerinckii</i> INIA 77	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. butyricum</i> CECT 361	Queso con hinchazón tardía	-
<i>C. butyricum</i> INIA 66	Queso con hinchazón tardía	-

¹ NCIMB: National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC: American Type Culture Collection; BCCM/LMG: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratorium voor Microbiologie en microbiële Genetica.

² La obtención de la endolisina y el ensayo de actividad lítica fueron llevados a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Mayer y col. (2010).

BIBLIOGRAFÍA

Mayer MJ, Payne J, Gasson MJ, Narbad A (2010) Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5415-5422.

Discusión General

1. *C. tyrobutyricum*: potente agente causal de la hinchazón tardía del queso

Como ya se ha comentado en los capítulos anteriores, la hinchazón tardía o fermentación butírica es una alteración de origen microbiano que se produce como consecuencia del crecimiento en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium* capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácidos butírico y acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Como resultado, la fermentación butírica origina defectos de textura, aroma y sabor en el queso que imposibilitan su comercialización. Por ello, la aparición de hinchazón tardía en los quesos supone un grave problema para las empresas lácteas debido a las importantes pérdidas económicas que se generan.

Tradicionalmente, la hinchazón tardía se ha relacionado con el crecimiento de *C. tyrobutyricum* en el queso, si bien, se ha sugerido que otras especies de *Clostridium* tales como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* podrían estar implicadas en esta alteración (Klijn y col. 1995; Cocolin y col. 2004; Le Bourhis y col. 2005, 2007; Garde y col. 2011a; b; Bassi y col. 2015). Por ello, el primer objetivo del presente trabajo de investigación fue estudiar el grado de implicación de estas especies de *Clostridium* en la hinchazón tardía. Para ello, se elaboraron cinco quesos modelo, de 200 g, con leche de oveja y con un fermento mesófilo, formado por un número reducido de cepas de *L. lactis*, y con esporas pertenecientes a *C. tyrobutyricum* CECT 4011, *C. butyricum* CECT 361, *C. tyrobutyricum* INIA 68, *C. beijerinckii* INIA 63 y *C. sporogenes* INIA 71 de manera individual. Las 3 últimas cepas fueron seleccionadas por presentar distintos pulsotipos representados por varios aislados procedentes de quesos Manchego con una hinchazón tardía pronunciada, y por producir grandes cantidades de gas y ácido butírico en leche y en medio con lactato (Garde y col. 2011a; 2012b). También se elaboró un queso solo con el fermento que sirvió como queso control. Los quesos se envasaron a vacío y se maduraron a 14 °C durante 60 días.

Los quesos elaborados solo con el fermento presentaron una textura uniforme sin rajaduras. Sin embargo, todos los quesos elaborados con esporas de *Clostridium* spp. presentaron síntomas de hinchazón, en distintos momentos de la maduración, aunque en diferente grado. Los primeros quesos en presentar esta alteración, a los 7 días de maduración, fueron los elaborados con *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y *C. tyrobutyricum* INIA 68, seguidos a los 50 días por el queso elaborado con *C. beijerinckii* INIA 63, a los 55 días por el elaborado con *C. sporogenes*

INIA 71 y, finalmente, a los 60 días por el elaborado con *C. butyricum* CECT 361. El grado de hinchazón de los quesos al final de la maduración fue inversamente proporcional al tiempo en el que apareció el defecto. Así, los quesos elaborados con las cepas de *C. tyrobutyricum* mostraron el mayor grado de hinchazón, caracterizado por una gran producción de gas en la bolsa de envasado, un intenso olor a ácido butírico y muchas rajaduras al corte. El queso elaborado con *C. beijerinckii* INIA 63 mostró un grado de hinchazón intermedio, con una producción de gas en la bolsa moderada, alguna raja al corte y un ligero olor a ácido butírico. En los quesos elaborados con *C. butyricum* CECT 361 y *C. sporogenes* INIA 71, apenas se apreciaron síntomas de hinchazón, ya que la producción de gas en la bolsa de envasado fue pequeña, y no se observaron rajaduras al corte ni olor a ácido butírico.

Además, los dos quesos elaborados con *C. tyrobutyricum* presentaron unos valores de pH superiores a los del queso control a partir de los 30 días como consecuencia de la desacidificación resultante del metabolismo de *Clostridium* spp. (Bogovic-Matijasic y col. 2007; Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2012a). Este efecto sobre el pH no se observó en los quesos elaborados con el resto de esporas, probablemente debido a que la aparición de hinchazón en estos quesos se produjo a partir de los 50 días, y por tanto, la desacidificación producida por *Clostridium* spp. a los 60 días fue insuficiente para apreciar cambios en el pH de los quesos.

Todos los quesos elaborados con esporas de *Clostridium* spp., excepto el elaborado con *C. butyricum* CECT 361, presentaron un perfil de compuestos volátiles significativamente ($P < 0,01$) diferente al del queso control a los 60 días de maduración. El número de compuestos afectados por el metabolismo de *Clostridium* spp. fue inversamente proporcional al tiempo en el que apareció la hinchazón y directamente proporcional al grado de la misma. Los quesos elaborados con *C. tyrobutyricum* presentaron los mayores niveles de ácido butírico. Sin embargo, y al contrario de lo esperado según lo descrito en la literatura, los niveles de ácido acético en estos quesos fueron los más bajos, hecho que podría explicarse porque el acetato es un intermediario que se requiere en altas concentraciones en la síntesis del ácido butírico (Yang y Zhu 2003). Además, los quesos elaborados con *C. tyrobutyricum* también presentaron los mayores niveles de ácidos propiónico y pentanoico. Por otra parte, el queso elaborado con *C. beijerinckii* INIA 63 presentó mayores niveles de ácidos propiónico y butírico que el queso control. Los mayores niveles de ácidos butírico y propiónico encontrados en nuestros quesos hinchados coinciden con lo descrito en la literatura para otros quesos con hinchazón tardía, ya

sean quesos artificialmente contaminados con esporas de *Clostridium* spp. o quesos comerciales (Bogovic-Matijasic y col. 2007; Le Bourhis y col. 2007; Garde y col. 2011b; 2012a). Sin embargo, en nuestro estudio es la primera vez que se describe el alto contenido de ácido pentanoico en quesos con este defecto.

El perfil de la fracción volátil de los quesos elaborados con esporas de *C. tyrobutyricum* también se caracterizó por la presencia de propanal, butanal y 1-pentanol, por los mayores niveles de 1-propanol y 1-butanol, y por la presencia de 2-propanol en el caso del queso elaborado con *C. tyrobutyricum* CECT 4011. Los quesos elaborados con *C. beijerinckii* INIA 63 y *C. sporogenes* INIA 71 presentaron mayores niveles de 2-butanol que el queso control, y el queso con *C. beijerinckii* INIA 63 también presentó mayores niveles de 1-propanol y 1-butanol. La presencia o mayor formación de algunos de estos compuestos puede atribuirse a la capacidad que tiene *Clostridium* spp. para cambiar su metabolismo de la acidogénesis a la solventogénesis cuando entra en la fase estacionaria de crecimiento (Amador-Noguez y col. 2011). En la solventogénesis los ácidos producidos en la acidogénesis durante la fase exponencial de crecimiento son transformados en solventes, produciéndose un incremento del pH externo lo que permite a la célula estar activa metabólicamente por más tiempo para poder esporular y garantizar su supervivencia.

Además, el perfil de compuestos volátiles de los quesos elaborados con *C. tyrobutyricum* se caracterizó por la presencia de 5 ésteres (propanoato de etilo, butanoato de metilo, butanoato de propilo, pentanoato de etilo y butanoato de butilo) y unos niveles muy elevados de butanoato de etilo, conforme a las altas concentraciones de los ácidos y alcoholes precursores encontrados en estos quesos. Por su parte, la fracción volátil de los quesos elaborados con *C. beijerinckii* INIA 63 y *C. sporogenes* INIA 71 también se caracterizó por unos altos niveles de 2,3-butanodiona y 2-butanona.

Klijn y col. (1995) solo detectaron hinchazón tardía en los quesos Gouda elaborados con leche artificialmente contaminada con esporas de *C. tyrobutyricum*, y por eso identificaron a esta especie como el agente causal de la hinchazón tardía del queso. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que otras especies de *Clostridium* son capaces de producir hinchazón en el queso, aunque en un grado mucho menor que *C. tyrobutyricum*, al que a la vista de nuestros resultados tenemos que considerar como un potente agente causal de la hinchazón tardía del queso.

2. Nisina y reuterina: antimicrobianos con amplio espectro de actividad frente a *Clostridium* spp. en medio líquido

En la actualidad existe una tendencia en los consumidores hacia alimentos mínimamente procesados, con menos conservantes y aditivos químicos. Consecuencia de ello es el interés creciente en la bioconservación mediante bacterias lácticas productoras de compuestos antimicrobianos. Por ello, nuestro siguiente objetivo (Objetivo 2) fue estudiar el empleo de bacterias lácticas productoras de compuestos antimicrobianos (concretamente productoras de nisina o reuterina) como estrategia alternativa a las existentes actualmente en las queserías para prevenir la hinchazón tardía del queso.

Antes de evaluar la inhibición de *Clostridium* spp. por bacterias lácticas productoras de antimicrobianos en queso, investigamos la sensibilidad de las esporas y células vegetativas de 4 especies de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes*) a nisina y reuterina en RCM (del inglés “reinforced clostridial medium”) y en leche mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Cada especie estuvo representada por tres cepas, una de colección y dos aisladas de quesos Manchego con hinchazón (Garde y col. 2011a). Las CMIs de estos antimicrobianos fueron comparadas con la lisozima y el nitrito, que son los inhibidores que se emplean en las queserías para prevenir la aparición de hinchazón tardía en el queso.

La sensibilidad de *Clostridium* spp. a los antimicrobianos fue cepa dependiente, pero en general *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* mostraron mayores CMIs que el resto de especies. Las CMIs también fueron en general mayores para las esporas que para las células vegetativas, y en leche que en RCM. La lisozima no fue capaz de inhibir a la máxima concentración ensayada (400 µg/ml), habitualmente empleada en las queserías, el crecimiento de *C. sporogenes*, lo que podría explicar que esta especie fuese la especie de *Clostridium* mayoritaria (79%) aislada de quesos Manchego con hinchazón tardía (Garde y col. 2011a). En general, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* se mostraron bastante resistentes a la acción de la lisozima. Sin embargo, este antimicrobiano resultó muy eficaz en la inhibición de dos de las tres cepas de *C. tyrobutyricum*. Experimentos posteriores en quesos Grana Padano con defectos anómalos en la pasta y con cavidades han mostrado que *C. tyrobutyricum* aparecía en niveles significativamente mayores en ausencia que en presencia de lisozima, que *C. butyricum* era la especie más prevalente cuando se añadió lisozima a la leche de fabricación, y que *C. sporogenes* parecía no ser afectado

por este antimicrobiano (Bassi y col. 2015), confirmando nuestros resultados hallados *in vitro*. Por otra parte, *C. tyrobutyricum*, junto con dos de las cepas de *C. butyricum*, fueron las que presentaron una mayor sensibilidad al nitrito sódico. Este antimicrobiano controló el crecimiento de todas las cepas de *Clostridium* pero a la concentración máxima ensayada en el caso de *C. beijerinckii*, dos cepas de *C. sporogenes* y una cepa de *C. butyricum*.

La reuterina (CMI: 0,51–32,5 mM) y la nisina (CMI: 0,05–12,5 µg/ml) fueron capaces de inhibir el crecimiento de las células vegetativas y esporas de todas las cepas de *Clostridium*, tanto en RCM como en leche. Por ello, se procedió al estudio de la inhibición de *Clostridium* por estos antimicrobianos naturales en quesos modelo, pero en esta ocasión empleando bacterias lácticas productoras de nisina o reuterina como fermentos o adjuntos en la elaboración de los mismos, con el fin de lograr su producción *in situ* en el queso.

3. El empleo de una cepa de *L. lactis* productora de nisina como fermento en la elaboración de queso solo retrasa la aparición de la hinchazón tardía

Para estudiar la eficacia de la nisina en el control de *C. tyrobutyricum* y prevención de la hinchazón ocasionada por este microorganismo (Objetivo 3), se elaboraron quesos modelo con *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, productor de nisina, como fermento, y con esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011. La bacteriocina fue detectada en el queso durante toda la maduración. Sin embargo, no fue suficiente para controlar el crecimiento de *Clostridium*, y la aparición de hinchazón tardía solo se retrasó una semana con el empleo de la cepa *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, en comparación con el queso elaborado con su mutante, no productor de nisina, apareciendo los síntomas del defecto a los 21 y 14 días de maduración, respectivamente. Sin embargo, el mismo productor de bacteriocina fue capaz de controlar el crecimiento de *C. beijerinckii* INIA 63 y prevenir la hinchazón tardía causada por esta cepa en quesos modelo artificialmente contaminados con esporas de este microorganismo durante 120 días de maduración (Garde y col. 2011b). Estos resultados resultaron inesperados, ya que como se ha visto *C. tyrobutyricum* CECT 4011 se mostró más sensible a la nisina que *C. beijerinckii* INIA 63 en RCM y leche (Capítulo 2 de esta Tesis Doctoral). La diferencia en la eficacia del empleo de *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 en la prevención de la hinchazón entre ambos estudios probablemente se deba a la mayor capacidad de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 para germinar y multiplicarse en el queso, como hemos visto en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral,

por lo que la concentración de nisina producida resultó en este caso insuficiente para controlar su crecimiento y evitar la aparición del defecto. Debido a ello, se decidió no continuar el estudio del efecto del productor de bacteriocina sobre las características del queso.

Por otra parte, en un estudio anterior el empleo del productor de nisina *L. lactis* subesp. *lactis* IPLA 729 como fermento, consiguió controlar el crecimiento de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y prevenir la hinchazón tardía en queso Vidiago (Rilla y col. 2003). La diferencia con nuestros resultados podría deberse a que los autores de este estudio inocularon el queso con células vegetativas en lugar de con esporas que son más resistentes, a la distinta cantidad de nisina producida por las dos cepas de lactococos, y/o a distintas características de los quesos.

4. La reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* previene la hinchazón tardía del queso

4.1. Sensibilidad de *C. tyrobutyricum* a la reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* en quesos modelo: optimización de la concentración de glicerol

Para evaluar la eficacia de la reuterina frente a *Clostridium* (Objetivo 4) en quesos modelo, se elaboraron los mismos con *Lb. reuteri* INIA P572 como adjunto, seleccionado por su alto rendimiento en la producción de reuterina, y con esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011. En la fabricación de queso se partió de leche pasteurizada de vaca, que se repartió en 8 cubas. En todas ellas se añadió un fermento comercial. Las esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 se inocularon en las cubas 2-7 y *Lb. reuteri* se añadió en las cubas 5-8. Además, se añadió glicerol a una concentración final de 50 mM en las cubas 3 y 6, y de 100 mM en las cubas 4 y 7 ya que, como se ha descrito en el Capítulo 3, es necesario para la producción de reuterina. Los quesos obtenidos, de 200 g, se envasaron a vacío y se maduraron a 14 °C durante 60 días.

Lb. reuteri INIA P572 sobrevivió adecuadamente a la fabricación de queso, con niveles de casi 7 log ufc/g a 1 día, y además fue capaz de producir reuterina *in situ* en aquellos quesos elaborados con glicerol y esta cepa. Durante la maduración, los niveles de *Lb. reuteri* INIA P572 y los de lactococos del fermento se mantuvieron prácticamente constantes en todos los quesos, excepto en los elaborados con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol, en los que se pudo apreciar un descenso en la viabilidad de *Lb. reuteri* INIA P572 y de los lactococos, siendo más pronunciado en el caso del queso elaborado con glicerol 100 mM. A pesar de este descenso en el recuento de los lactococos, la correcta acidificación de los quesos no se vio afectada. Langa y col. (2013)

describieron un efecto inhibitorio similar de la reuterina frente a *Lb. reuteri* y a los lactococos del fermento en un sistema de quesos modelo sin desuerar elaborados con cinco cepas de *Lb. reuteri* y glicerol 50 mM. Recientemente, Martin-Cabrejas y col. (2017) y Langa y col. (2018) han observado el mismo efecto inhibitorio de la reuterina sobre la cepa productora y el fermento en quesos elaborados con *Lb. reuteri* y glicerol.

Aunque se detectó reuterina en los quesos y sueros de los mismos elaborados con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol al comienzo de la maduración (6 y 24 h), a partir de los 14 días no se detectó su presencia, probablemente debido a su elevada reactividad química. El grupo β -hidroxilo de la reuterina hace que su grupo aldehído reaccione fácilmente con grupos sulfhidrilo, amino, hidroxilo o carbonilo (Vollenweider y Lacroix 2004; Vollenweider y col. 2010). En nuestra opinión, resulta factible que a medida que se fue produciendo la reuterina en el queso fuera reaccionando con los grupos sulfhidrilo de las moléculas y componentes de las bacterias presentes en el queso, ejerciendo su acción antimicrobiana (Schaefer y col. 2010; Vollenweider y col. 2010), pero también con los grupos amino de los péptidos y aminoácidos del queso (cuya concentración aumenta durante la maduración debido a la proteólisis), lo que conduciría a la disminución de la cantidad de reuterina detectable. En concordancia con nuestros resultados, Lüthi-Peng y col. (2002) observaron que al añadir caseinato de sodio o distintos hidrolizados de caseína al medio de cultivo y aumentar los grupos amino libres del mismo, disminuía la cantidad de reuterina detectable. Además, los distintos procesos de elaboración y maduración del queso parecen tener gran influencia en la producción *in situ* de reuterina. Así, Langa y col. (2013) sí detectaron reuterina durante los 30 días de maduración en casi todos los sistemas de quesos modelo elaborados con distintas cepas de *Lb. reuteri* y glicerol, registrando una concentración máxima de reuterina de 5,7 mM a los 10 días de maduración. La diferencia con nuestros resultados podría atribuirse a diversos factores. Por una parte, estos sistemas de quesos modelo no fueron desuerados, por lo que no se producirían pérdidas ni de reuterina ni de glicerol en este proceso. Por otra parte, estos autores maduraron los quesos en anaerobiosis, lo que favorecería la producción de reuterina por parte de *Lb. reuteri*, y a 12 °C frente a los 14 °C de nuestros quesos, y se conoce que la estabilidad de la reuterina en leche disminuye conforme aumenta la temperatura (Lüthi-Peng y col. 2002). En el trabajo de Martin-Cabrejas y col. (2017) también se detectó reuterina en quesos elaborados con *Lb. reuteri* y glicerol durante los 30 días de maduración, registrando una concentración máxima media de 4,7

mM en los quesos de 1 día elaborados con glicerol 100-500 mM. En este estudio también maduraron los quesos a 12 °C frente a los 14 °C de nuestro trabajo, lo que aumentaría la estabilidad de la reuterina durante la maduración. Otra circunstancia que también puede explicar los diferentes resultados sería que en nuestro caso inoculamos la leche con una unidad logarítmica de *Lb. reuteri* más que Martin-Cabrejas y col. (2017), lo que se podría traducir en una producción más temprana y mayor de reuterina en nuestros quesos durante las primeras etapas de elaboración, favorecida además por las temperaturas empleadas en esas etapas del proceso (30-38 °C). A su vez, dichas temperaturas también favorecerían la reactividad de la reuterina con compuestos de la leche y la cuajada, condicionando su detección. Por último, el lavado de la cuajada que realizamos en la elaboración de nuestros quesos también podría explicar la diferencia entre estudios, por pérdida de reuterina y/o glicerol en el agua de lavado. Por otra parte, y más en línea con nuestros resultados, Langa y col. (2018) solo detectaron reuterina en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol hasta los 7 días dentro de los 30 días de maduración que duró el estudio.

Aunque en nuestro trabajo solo se detectó reuterina a las 6 y 24 h, la cantidad producida fue suficiente para inhibir el desarrollo de *C. tyrobutyricum*, con recuentos de esporas indetectables a partir de los 30 días en los quesos modelo elaborados con *Lb. reuteri* y glicerol y, por tanto, para prevenir la hinchazón tardía durante los 60 días de maduración. La inhibición del crecimiento de *Clostridium* en estos últimos quesos no puede atribuirse a diferencias de pH o de actividad de agua, ya que no se registraron diferencias significativas para estos parámetros entre los quesos antes de producirse la hinchazón tardía. Como se puede ver en el Capítulo 2 de esta Tesis, la CMI de reuterina para *C. tyrobutyricum* CECT 4011 fue de 4,1 y 8,1 mM en leche y RCM, respectivamente. En nuestros quesos la concentración detectada de reuterina fue inferior a esos valores, pero existen diversos factores en el queso que pueden actuar de manera sinérgica con la reuterina (pH, sal, temperatura, etc...) y aumentar su actividad antimicrobiana. La aplicación de un recubrimiento de alginato sódico con *Lb. reuteri* y glicerol sobre la superficie del queso Fior di Latte prolongó su calidad microbiológica, ya que inhibió el crecimiento de *Pseudomonas* spp. y enterobacterias, alargando por tanto su vida útil (Angiolillo y col. 2014). Recientemente, Langa y col. (2018) han observado una fuerte actividad antimicrobiana de la reuterina frente a *Li. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol.

Todos los quesos contaminados artificialmente con *C. tyrobutyricum* CECT 4011, salvo los dos en los que se detectó reuterina (elaborados con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol), desarrollaron hinchazón tardía en distintos momentos de la maduración. La aparición del defecto se observó a los 21 días en el queso elaborado con el fermento y las esporas de *Clostridium* y en el elaborado además con glicerol 50 mM. Sin embargo, la adición de *Lb. reuteri* INIA P572 al queso, sin glicerol, estimuló la germinación y el crecimiento de *C. tyrobutyricum*, adelantando la aparición de hinchazón a los 14 días, probablemente debido al metabolismo del lactobacilo. El crecimiento de *Clostridium* se ve favorecido por la presencia de otros microorganismos en el queso, como coliformes, lactococos, leuconostocs, lactobacilos y propionibacterias (Goudkov y Sharpe 1965). Esta estimulación se ha atribuido a la bajada del potencial redox del queso y a la producción de algunos metabolitos por parte de estos microorganismos. La adición de glicerol 100 mM en la elaboración del queso, en cambio, retrasó el desarrollo de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y la aparición de la hinchazón hasta los 30 días. Se ha observado que la tasa de crecimiento de *C. tyrobutyricum* disminuye con el aumento de la concentración de glicerol (Huchet y col. 1995) y que la presencia de glicerol 20 mM reprime la esporulación de *C. sporogenes* hasta el 80% (Venugopal y Nadkarni 1977).

Acorde a lo descrito y a la literatura comentada en el apartado 1 de esta discusión, los quesos con hinchazón mostraron valores de pH mayores al final de la maduración, coincidiendo con el crecimiento de *C. tyrobutyricum*, menores niveles de ácido láctico y mayores de ácidos propiónico y butírico que el queso control, solo elaborado con el fermento comercial. Sin embargo, los quesos elaborados con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol mostraron el mismo perfil de ácidos orgánicos que el queso control.

Aunque la reuterina previno la hinchazón del queso causada por *C. tyrobutyricum*, el queso elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol 100 mM presentó un defecto de color. Este queso mostró valores de a^* positivos y significativamente mayores que los del resto de quesos que se tradujeron en la aparición de una ligera tonalidad rosa. Esta coloración rosa podría deberse a la transformación por deshidratación de parte de la reuterina a acroleína (2-propenal) y a la posterior unión de ésta a algunos grupos amino libres de péptidos y/o aminoácidos presentes en el queso. Esta hipótesis estaría basada en la reacción que se produce en el ensayo colorimétrico empleado para la determinación de la reuterina (Lüthi-Peng y col. 2002). En esta reacción, la acroleína formada por deshidratación a partir de la reuterina en

medio ácido y favorecida por calor, se une al triptófano dando lugar a un compuesto de color rosa-violáceo. Por otra parte, está descrito que la reuterina es menos estable en leche que en agua, atribuyéndose este hecho a la unión de la reuterina con grupos amino libres de los péptidos presentes en la leche (Lüthi-Peng y col. 2002). Además, un estudio reciente ha revelado una conversión espontánea y rápida de la reuterina a acroleína por deshidratación, atribuyendo la actividad antimicrobiana de la reuterina a la acroleína y, por tanto, proponiendo la redefinición del término reuterina como un sistema formado por el 3-HPA, el dímero HPA, el HPA hidrato, y también por la acroleína (Engels y col. 2016). La aparición de este defecto por primera vez en nuestro trabajo podría atribuirse a la mayor temperatura y/o tiempo de maduración de los quesos (14 °C durante 60 días) frente a las temperaturas y tiempos de conservación o maduración de otros estudios llevados a cabo en leche o productos lácteos (El-Ziney y Debevere 1998; Arqués y col. 2004, 2008a, b, 2011; Langa y col. 2013) ya que, como se ha mencionado previamente, la estabilidad de la reuterina en leche disminuye conforme aumenta la temperatura (Lüthi-Peng y col. 2002). Recientemente, Martín-Cabrejas y col. (2017) también han descrito este defecto en quesos elaborados con *Lb. reuteri* y glicerol 200 y 500 mM.

A diferencia de la nisina producida *in situ* por *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415, la reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* INIA P572 sí fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. tyrobutyricum* y prevenir la aparición de hinchazón del queso durante 60 días de maduración.

4.2. Validación de la inhibición en queso de tamaño real

En la investigación de nuevas estrategias de conservación del queso con el fin de garantizar su seguridad ante la amenaza de microorganismos patógenos y/o de evitar la aparición de defectos por microorganismos alterantes, resulta imprescindible la validación de las mismas en queso de tamaño real, elaborado y madurado en condiciones reales con vistas a su posible aplicación industrial. Por ello, dentro del Objetivo 4 de la presente Tesis Doctoral, elaboramos quesos de aproximadamente 3 kg siguiendo la tecnología de elaboración y maduración del queso Castellano. Además del tamaño de los quesos y de la tecnología empleada en su elaboración, existieron otras diferencias con respecto a los quesos modelo. La primera fue la elección de leche de oveja para elaborar los quesos porque la hinchazón tardía es más

frecuente en quesos de oveja, ya que son madurados durante más tiempo. Contaminamos la leche con esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68, que es una cepa aislada de un queso de oveja con hinchazón (Garde y col. 2011a). Añadimos glicerol a una menor concentración (concentración final de 30 mM) porque la leche de oveja tiene menor contenido en agua que la de vaca, y porque no lavamos la cuajada, por lo que preveíamos una menor pérdida de reuterina y/o glicerol durante el desuerado. Por último, maduramos los quesos 90 días, un mes más que en los quesos modelo, y sin envasar a vacío.

En los quesos de tamaño real, la reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* INIA P572 en presencia de glicerol controló el crecimiento de *C. tyrobutyricum* INIA 68 y previno la hinchazón causada por este microorganismo durante toda la maduración. Estos resultados, junto con los anteriores, muestran que *Lb. reuteri* es capaz de producir reuterina, y que ésta es capaz de ejercer su acción antimicrobiana, tanto en queso de leche de vaca como de oveja, en presencia de distintos fermentos y en condiciones de fabricación a escala industrial. Los resultados obtenidos en los distintos parámetros estudiados en los quesos de tamaño real fueron en general similares a los obtenidos en quesos modelo. Por eso, solo haremos referencia en esta discusión a aquellos aspectos que resultaron diferentes.

El primer aspecto a discutir, y quizás el más sorprendente, fue el comportamiento de *C. tyrobutyricum* INIA 68 durante la elaboración y maduración de los quesos de tamaño real. En los quesos modelo, las esporas de este microorganismo germinaron durante la maduración del queso, reflejándose en un descenso en el recuento de esporas en el momento de la aparición de la hinchazón (Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral). Tras la aparición del defecto, los niveles de esporas aumentaron indicando un crecimiento y esporulación de las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* INIA 68. La cepa *C. tyrobutyricum* CECT 4011 presentó el mismo comportamiento durante la elaboración y maduración de los quesos modelo (Capítulo 1 y 3 de esta Tesis Doctoral). Sin embargo, en los quesos de tamaño real se observó un descenso en el recuento de esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68 de aproximadamente 2,5 unidades logarítmicas durante el prensado del queso (2-6 h), señal de una germinación temprana de las mismas. A partir de ese momento, los recuentos se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del tiempo, sugiriendo que este microorganismo no fue capaz de esporular durante la maduración del queso. Las diferencias en el comportamiento de *C. tyrobutyricum* podrían atribuirse al distinto tamaño de los quesos y/o a las diferentes condiciones de fabricación o

maduración. El bajo número de esporas encontrado previamente en quesos Manchego con hinchazón (Garde y col. 2012a) indica que *Clostridium* no esporula en gran medida en el queso, independientemente de que sus células vegetativas sean capaces de crecer en el mismo y causar hinchazón tardía.

Además de las determinaciones llevadas a cabo en el estudio en quesos modelo, en los quesos de tamaño real también investigamos la fracción volátil de los quesos con hinchazón tardía. Acorde a lo descrito en el apartado 1 de esta discusión, el perfil volátil de los quesos hinchados (el elaborado con esporas y el elaborado con esporas y *Lb. reuteri* pero sin glicerol) se caracterizó por un incremento en la formación de 1-butanol, ácidos propiónico y butírico, y butanoato de etilo. Además, solo en estos quesos se detectó la presencia de ácidos pentanoico y 4-hexenoico. En el queso hinchado elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 (sin glicerol), también se detectó la presencia de butanoato de metilo, butanoato de propilo y pentanoato de etilo, acorde a una mayor concentración de compuestos precursores en este queso y a su mayor grado de hinchazón. Sin embargo, el queso con reuterina y contaminado con esporas de *Clostridium*, sin síntomas del defecto, presentó un perfil para estos compuestos volátiles muy similar al del queso control elaborado solo con el fermento.

4.3. Efecto de *Lb. reuteri* y la reuterina producida *in situ* sobre las características del queso

Para completar la validación de la estrategia, estudiamos el efecto de *Lb. reuteri* y la reuterina sobre las características físico-químicas y sensoriales del queso (Objetivo 4). Este estudio se llevó a cabo en quesos de tamaño real de 3 kg sin esporas de *Clostridium*. Para ello, se elaboraron tres quesos, uno con el fermento (control), otro con el fermento y *Lb. reuteri* INIA P572, y el tercero con el fermento, *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol, en el que se comprobó la producción de reuterina.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,01$) entre los quesos para el pH a las 24 h. Sin embargo, el queso con reuterina mostró mayores valores de pH a partir de los 30 días de maduración, hecho que podría atribuirse a los menores recuentos de lactococos registrados en este queso. Langa y col (2018) también registraron menores recuentos de lactococos y mayores valores de pH en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol que en el queso control. En cambio, el efecto inhibitorio de la reuterina sobre los lactococos del fermento no tuvo ningún efecto sobre el pH en nuestros quesos modelo.

Los quesos presentaron valores similares de extracto seco a lo largo de la maduración. Sin embargo, el queso con reuterina presentó mayor índice de proteólisis global, mayores valores de actividad aminopeptidásica y niveles de aminoácidos libres totales que el queso control y el elaborado con *Lb. reuteri* pero sin glicerol. En cambio, el queso elaborado con *Lb. reuteri* sin glicerol mostró unos valores de proteólisis global, aminoácidos libres y actividad aminopeptidásica similares a los del queso control. Por tanto, la mayor proteólisis observada en el queso con reuterina podría atribuirse a un efecto lítico de ésta sobre las células del fermento y del propio *Lb. reuteri* INIA P572, que daría lugar a la liberación de su contenido enzimático intracelular (peptidasas) a la matriz del queso, favoreciendo la formación de péptidos pequeños y aminoácidos. Esta capacidad lítica y posterior liberación de peptidasas intracelulares ha sido descrita para otros antimicrobianos producidos por bacterias lácticas como las bacteriocinas (Beshkova y Frengova 2012), pero hasta esta Tesis Doctoral no había sido descrita para la reuterina. Por otra parte, el mayor pH observado en el queso con reuterina durante la maduración también pudo contribuir a la mayor proteólisis observada en este queso, ya que la mayoría de las enzimas proteolíticas tienen un pH óptimo de actividad cercano a la neutralidad.

En consonancia con la mayor proteólisis observada en el queso con reuterina, este queso mostró menores valores de firmeza y elasticidad que el queso control y que el queso elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 y sin glicerol. La proteólisis contribuye a la modificación de la textura del queso durante la maduración, tanto con la hidrólisis de la matriz de caseínas como con la disminución de actividad de agua, debido a que los nuevos grupos amino y carboxilo formados durante la hidrólisis de los enlaces peptídicos ligan nuevas moléculas de agua (McSweeney 2004). Por otra parte, los mayores valores de pH del queso con reuterina también pudieron afectar a la textura, ya que cambios en el pH están directamente relacionados con cambios químicos en la matriz de caseínas (Singh y col. 2003).

En cuanto al color, el queso con reuterina presentó menores valores de L^* (luminosidad), b^* (tendencia al amarillo) y C^* (saturación) y mayores de a^* (tendencia al rojo) que el queso control y el elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 y sin glicerol. La diferencia de algunos de estos parámetros entre los quesos también podría atribuirse a diferencias de pH y proteólisis encontradas entre los mismos. Los mayores valores de a^* también fueron registrados en nuestros quesos modelo elaborados con *Lb. reuteri* y glicerol, que en el caso del queso elaborado con glicerol 100 mM fueron positivos dando lugar a la aparición de un defecto de

color rosa. Sin embargo, en los quesos de tamaño real no se apreció este defecto, ya que los valores de a^* se mantuvieron en valores negativos.

En lo que se refiere al efecto de *Lb. reuteri* INIA P572 sobre la fracción volátil del queso, la adición del adjunto dio lugar a la formación de 2-butanol y 3-metil-1-butanol, y a un incremento de la formación de 2-butanona, 1-propanol, 2-propen-1-ol y 3-metil-2-buten-1-ol. La adición de *Lb. reuteri* y glicerol tuvo un mayor efecto sobre la fracción volátil del queso. La fracción volátil del queso con reuterina se caracterizó fundamentalmente por la aparición o incremento de la formación de compuestos relacionados, o que podrían estarlo teniendo en cuenta su estructura molecular, con el metabolismo del glicerol, tales como propanal, 2-propenal (acroleína), 1-propanol, 2-propen-1-ol, 1,3-propanodiol, ácido propiónico, 1-etoxi-2-metilpropano e isopropil éter. Este queso también presentó mayores niveles de algunos compuestos cuyo origen podría atribuirse al catabolismo de aminoácidos (3-hidroxi-2-butanona, ácido acético, 2,3-pentanodiona y 3-metilpiridina). Por otra parte, la adición de *Lb. reuteri* con el glicerol dio lugar a la disminución de la formación de algunos compuestos (etanol, acetato de etilo, butanoato de etilo, 2-heptanona y sulfuro de dimetilo), lo que podría relacionarse con los menores recuentos de bacterias lácticas en este queso. La discusión detallada sobre la formación de cada uno de estos compuestos se encuentra en el Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral. En esta discusión general nos ceñiremos a comentar los posibles orígenes de la acroleína, que solo se detectó en la fracción volátil del queso elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol, dada la importancia de este compuesto por la toxicidad que puede presentar.

La ausencia de reuterina (3-hidroxiopropanal) y presencia de acroleína (2-propenal) en la fracción volátil del queso elaborado con *Lb. reuteri* INIA P572 y glicerol, induce a pensar en una transformación total de la primera en la segunda por deshidratación. El dilema es si esta transformación se produjo en el queso o durante el análisis de la fracción volátil del mismo, ya que esta transformación se ve favorecida a medida que aumenta la temperatura (en el protocolo de determinación de compuestos volátiles se alcanzan hasta 260 °C). Para tratar de dilucidarlo, sometimos un extracto purificado de reuterina a la técnica empleada en la determinación de la fracción volátil del queso y observamos una transformación total de reuterina en acroleína. No obstante, no podemos descartar la presencia de acroleína en el queso, y más teniendo en cuenta el reciente estudio llevado a cabo por Engels y col. (2016) que revela una conversión espontánea y rápida de la reuterina a acroleína en condiciones fisiológicas. Por ello, sería muy interesante

llevar a cabo estudios adicionales sobre el metabolismo que la reuterina sufre en el queso, y quizás más interesante sobre el metabolismo que sufre durante la masticación y su paso por el aparato digestivo. Por otra parte, también sería interesante realizar estudios sobre su toxicidad. En este sentido, Fernández-Cruz y col. (2016) han estudiado la citotoxicidad aguda de la reuterina frente a la línea celular Hep G2. La reuterina presentó un perfil de toxicidad moderado, siendo sus niveles de toxicidad muy inferiores a los de la acroleína y cuatro veces superiores a los del diacetilo, un saborizante empleado en la industria alimentaria.

Pese a las diferencias encontradas en el perfil de compuestos volátiles entre el queso elaborado solo con el fermento y los quesos elaborados con *Lb. reuteri*, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,01$) para la calidad del olor y aroma ni para la intensidad del aroma. Sin embargo, la intensidad del olor fue menor en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol, circunstancia que podría explicarse por la menor formación de algunos compuestos volátiles (acetaldehído y ésteres de etilo) en este queso. Por otra parte, la mayor proteólisis registrada en el queso elaborado con *Lb. reuteri* y glicerol se reflejó en unas mayores puntuaciones para la calidad de sabor. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los quesos para la calidad de la textura y del color. El análisis sensorial resulta imprescindible en la validación de cualquier estrategia de conservación de alimentos, ya que los cambios registrados por la aplicación de la misma mediante la determinación de distintos parámetros instrumentales, no siempre se reflejan en cambios organolépticos en el producto, y viceversa.

5. La aplicación de un solo ciclo de alta presión previene la hinchazón tardía del queso

La tecnología de altas presiones es probablemente el método de conservación de alimentos alternativo a los tradicionales tratamientos térmicos que está más desarrollado comercialmente, ya que esta tecnología permite la inactivación de microorganismos patógenos y alterantes, y prolongar la vida útil de los alimentos, con bajo impacto en su calidad nutritiva y sensorial. Sin embargo, la inactivación de esporas mediante altas presiones es un gran desafío debido a la elevada resistencia que éstas presentan. No obstante, la germinación de las esporas inducida por las altas presiones provoca, en ciertos casos, que las esporas pierdan su

resistencia y puedan ser inactivadas con tratamientos posteriores (Black y col. 2007b; Sarker y col. 2015).

Hasta la fecha, no existen muchos estudios sobre la aplicación de altas presiones para inactivar esporas de *Clostridium* en alimentos, y no tenemos conocimiento de que exista alguno en queso. Para optimizar la destrucción de esporas mediante altas presiones se han empleado predominantemente dos estrategias: la combinación de altas presiones y altas temperaturas (60-90 °C) y los tratamientos cíclicos de altas presiones. La primera de ellas es inviable para su aplicación en queso, ya que la aplicación de altas temperaturas afectaría negativamente a las características sensoriales del mismo. Por ello, los estudios en queso están basados en la segunda estrategia. En este sentido, Capellas y col. (2000) y López-Pedemonte y col. (2003) estudiaron la inactivación de esporas de *Bacillus* spp. en queso mediante la aplicación de un ciclo de germinación (60 MPa, 210 min) seguido de un ciclo de inactivación (400-500 MPa).

5.1. Prevención de hinchazón tardía en un sistema modelo de queso mediante la aplicación de altas presiones: optimización de ciclos

Para realizar los estudios previos de inhibición de *C. tyrobutyricum* por tratamientos de altas presiones (Objetivo 5) se utilizaron cuñas de queso como sistema modelo. Para ello, se elaboraron quesos de leche de oveja (de aproximadamente 1 kg) con un fermento mesófilo y esporas de *C. tyrobutyricum* INIA 68, y siguiendo el procedimiento de elaboración del queso Castellano. Los quesos fueron fraccionados en cuñas, éstas envasadas al vacío y tratadas por distintos tratamientos de alta presión a los 7 días de maduración. Los tratamientos de alta presión combinaron un ciclo de germinación (100 MPa, 30 min) y uno o tres de inactivación (400 MPa, 15 min ó 3 ciclos de 400 MPa, 5 min). También se ensayaron los tres tratamientos por separado (el de germinación y los dos de inactivación).

Al igual que sucedió en los quesos de tamaño real del apartado 4.2 de esta discusión, se observó una germinación temprana de las esporas de *C. tyrobutyricum* durante el prensado de los quesos, y una baja o nula tasa de esporulación durante la maduración.

El ciclo de germinación no aumentó la tasa de germinación de las esporas de *C. tyrobutyricum* que no habían germinado durante el prensado del queso, por lo que su aplicación en combinación con los tratamientos de inactivación no supuso ninguna ventaja con

respecto a la aplicación de solo los ciclos de inactivación. La aplicación de 138 MPa durante 30 min (6 ciclos de 5 min) combinada con un tratamiento previo a 70 °C sobre una suspensión de esporas de *C. tyrobutyricum* en agua, no supuso un aumento de la tasa de germinación con respecto al tratamiento térmico (Bassi y col. 2009). Estos mismos autores observaron, mediante microscopía electrónica de barrido, que las esporas de *C. tyrobutyricum* permanecían con su exosporium tras el tratamiento de alta presión. Recientemente, se ha descrito que las altas presiones son capaces de inducir la germinación de *Bacillus* pero no la de la mayoría de las especies y cepas de *Clostridium* estudiadas hasta el momento, debido a los distintos mecanismos implicados en su germinación (Sarker y col. 2015; Doona y col. 2016).

La aplicación de los tres ciclos de 5 min a 400 MPa tampoco supuso ninguna ventaja frente al tratamiento de 15 minutos a 400 MPa en la inactivación de esporas, pese a que se ha descrito que los tratamientos cíclicos podrían resultar más eficaces que los individuales cuando la exposición es equivalente (Hayakawa y col. 1994), ya que la repetición de la descompresión rápida causa daños, alteración e inactivación de las esporas germinadas (Furukawa y col. 2003). Por otra parte, en nuestro estudio la reducción de esporas debida a la aplicación de los distintos tratamientos a 400 MPa fue baja. Moerman (2005) también registró una baja reducción en el número de esporas de *C. tyrobutyricum* (0,48 log ufc/g) cuando trataron un estofado de cerdo artificialmente contaminado con las mismas a 400 MPa (30 min, 20 °C).

Respecto a la hinchazón tardía, solo presentaron síntomas la cuña del queso elaborado con esporas de *C. tyrobutyricum* que no fue presurizada y la presurizada a 100 MPa, que también mostraron mayores valores de pH, menores niveles de ácido láctico y la formación de ácidos propiónico y butírico, comparadas con la cuña del queso control sin esporas. Este resultado, unido a los obtenidos para el recuento de esporas, nos llevan a pensar que los tratamientos de 400 MPa aplicados a los 7 días inactivaron las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* procedentes de las esporas que germinaron durante el prensado del queso, y que existe una fracción de esporas que nunca germinó durante la maduración del mismo.

Por otra parte, parece que la aplicación de 100 MPa retrasó la aparición de hinchazón tardía, ya que la cuña del queso con esporas tratada a esta presión mostró a los 60 días, de manera significativa ($P < 0,01$), mayor nivel de ácido láctico y menores niveles de ácidos propiónico y butírico que la cuña del queso con esporas y no presurizada. Este resultado nos

sugirió que las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* eran muy sensibles a la presión, y que tratamientos de altas presiones más suaves (inferiores a 400 MPa y/o más cortos) podrían ser efectivos para el control y prevención de la hinchazón tardía en el queso.

5.2. Prevención de la hinchazón tardía en queso de tamaño real mediante la aplicación de un solo ciclo de alta presión

Considerando los resultados obtenidos con altas presiones en el sistema modelo de queso, se procedió a estudiar esta estrategia de prevención de la hinchazón en queso de tamaño real (Objetivo 5). Para ello, se elaboraron 3 cubas de queso de leche cruda de oveja. En todas las cubas se añadieron a la leche un fermento mesófilo y un fermento termófilo. La leche de las cubas 2 y 3 fue contaminada intencionadamente con esporas de *C. tyrobutyricum* CECT 4011 y *C. tyrobutyricum* INIA 68, respectivamente. De cada cuba se obtuvieron 6 quesos de aproximadamente 1,5 kg, 4 de los cuales fueron sometidos a distintos tratamientos individuales de altas presiones (200-500 MPa, 14 °C, 10 min) a los 7 días de maduración, y posteriormente madurados a 12 °C durante 60 días.

Los quesos con esporas de *C. tyrobutyricum* no presurizados y los presurizados a 200 MPa mostraron signos visibles de hinchazón tardía a los 60 días, que estuvieron acompañados por menores concentraciones de ácido láctico y mayores niveles de ácidos propiónico, butírico y pentanoico, 1-butanol, butanoato de etilo y de metilo, y pentanoato de etilo que los quesos control elaborados sin esporas, y conforme a todo lo comentado anteriormente respecto a los quesos hinchados en esta discusión general. Sin embargo, los quesos elaborados con esporas de *Clostridium* y tratados con altas presiones a ≥ 300 MPa no mostraron síntomas de hinchazón tardía, y sus perfiles de ácidos orgánicos y de compuestos volátiles fueron similares a los de sus respectivos quesos sin esporas tratados por altas presiones, pese a que los tratamientos de altas presiones causaron una baja reducción en el número de esporas. Durante el proceso de elaboración de los quesos se observó un descenso acusado del número de esporas tras la etapa de prensado, lo que parece indicar una germinación temprana de las mismas. Este fenómeno, junto con la baja inactivación de esporas observada en los quesos, sugiere que los tratamientos de altas presiones ≥ 300 MPa fueron capaces de inactivar las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* surgidas tras la germinación, metabólicamente activas, y prevenir de esta manera la aparición de hinchazón tardía en el queso.

5.3. Efecto de las altas presiones sobre las características del queso

Por otra parte, se estudió el efecto de las altas presiones sobre las características del queso de leche cruda de oveja (Objetivo 5). Ninguno de los tratamientos de altas presiones afectó al pH, extracto seco o la actividad de agua del queso. Sin embargo, la inactivación de la microbiota del queso fue mayor a medida que se incrementó la presión aplicada. Los quesos tratados a 200 MPa mostraron unos recuentos de bacterias lácticas mesófilas y termófilas, enterococos y micrococáceas similares a los del queso control no presurizado. Sin embargo, los recuentos de bacterias lácticas mesófilas, enterococos y micrococáceas fueron inferiores ($P < 0,01$) en el queso presurizado a 300 MPa, y no se detectó la presencia de ninguna de las bacterias estudiadas en los quesos presurizados a 400 y 500 MPa, exceptuando los lactobacilos en el queso presurizado a 400 MPa, que mostró un recuento similar al del queso no presurizado. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otras variedades de queso de oveja tratadas por altas presiones (Arqués y col. 2006; Juan y col. 2007a, c; Moschopoulou y col. 2010), si bien, la comparación entre resultados resulta difícil, ya que la inactivación microbiana depende de varios factores como las características de la variedad de queso, las condiciones del tratamiento (presión, tiempo y temperatura), el momento de la maduración en el que se aplica, y el número y tipos de microorganismos presentes.

Los quesos presurizados presentaron menores valores de actividad aminopeptidásica que el queso control, siendo esta menor a medida que se incrementó la presión. Esto sugiere una inactivación de las enzimas por las altas presiones, aunque los menores recuentos de microorganismos observados en estos quesos también podrían explicar la menor actividad aminopeptidásica registrada. Resultados similares han sido descritos para otras variedades de queso de oveja presurizadas (Garde y col. 2007; Juan y col. 2007b; Calzada y col. 2013), aunque el efecto contrario también ha sido observado (Garde y col. 2007; Juan y col. 2007b; Giannoglou y col. 2016), ya que las altas presiones pueden causar la activación, la inactivación o no tener efecto sobre las diferentes enzimas proteolíticas de una misma bacteria en función de la presión aplicada y de la enzima (Malone y col. 2003).

Pese a los menores valores de actividad aminopeptidásica, en los quesos presurizados a 200, 300 y 400 MPa los valores de proteólisis global no se vieron afectados, y las concentraciones de aminoácidos libres totales fueron mayores que en el queso control. Los mayores niveles de aminoácidos en los quesos tratados a 200 y 300 MPa podrían explicarse por

una mayor susceptibilidad de los péptidos a la acción de las peptidasas, tras sufrir cambios conformacionales por la aplicación de la alta presión. En el caso del queso tratado a 400 MPa, una posible explicación sería una reducción en el catabolismo de aminoácidos, teniendo en cuenta sus menores niveles de microorganismos.

La abundancia relativa de algunos compuestos volátiles del queso se vio afectada por la aplicación de las altas presiones, siendo mayor el número de compuestos afectados cuanto mayor fue la presión aplicada. Por lo general, la aplicación de las altas presiones frenó la formación de los compuestos volátiles afectados, y en la mayoría de los casos se asoció con los menores recuentos de microorganismos presentes en los quesos. Resultados similares han sido obtenidos en otras variedades de queso de oveja sometidas a altas presiones (Arqués y col. 2007; Juan y col. 2007a).

En cuanto a la textura, los quesos presurizados mostraron mayores valores de fracturabilidad y valores similares de firmeza y elasticidad que el queso control. Juan y col. (2007b) describieron mayores diferencias en la textura de los quesos presurizados a ≥ 300 MPa que atribuyeron a sus mayores valores de pH. En nuestro caso, los valores de pH de los quesos fueron similares. En lo que se refiere al color, los quesos presurizados mostraron menores valores del parámetro a^* y mayores de h° que los mostrados por el queso control. Además, los quesos presurizados a 400 y 500 MPa presentaron mayores valores de los parámetros b^* y C^* . En esta Tesis Doctoral se ha estudiado por primera vez el efecto de las altas presiones sobre el color de un queso de oveja.

A pesar de las diferencias encontradas en los parámetros instrumentales entre los quesos presurizados y el queso control, los quesos presurizados a 200-400 MPa obtuvieron unas puntuaciones similares a las del queso control para la intensidad y calidad del olor, aroma y sabor, calidad de la textura y calidad del color tras ser evaluados por una panel de catadores. Sin embargo, la intensidad del sabor del queso presurizado a 500 MPa fue inferior a la del queso control, probablemente debido a la menor concentración de algunos aminoácidos tales como Gly, Arg, Ala, Val, Met, Ile, Leu y Phe, ya que estos contribuyen al sabor del queso (Zhao y col. 2016). En cambio, la calidad del aroma del queso tratado a 500 MPa fue superior, y podría deberse a un mejor equilibrio entre los compuestos volátiles responsables del aroma de esta variedad de queso.

El mejor tratamiento de altas presiones sería aquel que garantizara la inactivación de los microorganismos indeseables sin afectar, o afectando mínimamente, a las características del queso. Teniendo en cuenta esta premisa y los resultados obtenidos, podemos concluir que el tratamiento a 300 MPa es el más adecuado para prevenir la hinchazón tardía del queso causada por *C. tyrobutyricum*.

6. La endolisina CTP1L presenta un espectro de actividad lítica limitado frente a *Clostridium* spp.

Los bacteriófagos y sus endolisinas constituyen excelentes herramientas para el control de microorganismos patógenos y alterantes en alimentos, debido a su capacidad para reconocer específicamente y lisar eficazmente las células diana sin afectar a una posible microbiota secundaria beneficiosa. En leche y productos lácteos, el uso de endolisinas fágicas ha sido ensayado con éxito frente a distintos patógenos alimentarios (Rodríguez-Rubio y col. 2015; Guo y col. 2016; Schmelcher y Loessner 2016; Chang y col. 2017; Van Tassell y col. 2017), por lo que nos planteamos que el empleo de las mismas podría ser una estrategia interesante para controlar el crecimiento de *Clostridium* spp. en el queso (Objetivo 6), y prevenir así la hinchazón tardía.

En nuestro estudio, se evaluó la capacidad lítica de la endolisina CTP1L, codificada por el bacteriófago virulento Φ CTP1 de *C. tyrobutyricum* (Mayer y col. 2010), frente a 6 cepas de *C. tyrobutyricum*, 3 cepas de *C. sporogenes*, 2 cepas de *C. butyricum* y 9 cepas de *C. beijerinckii*, la mayoría aisladas de quesos Manchego con hinchazón tardía.

No se observó actividad lítica de la endolisina frente a ninguna de las cepas de *Clostridium* aisladas de quesos con hinchazón. Solo se observó esta actividad frente a *C. tyrobutyricum* NCIMB 9582 y *C. sporogenes* ATCC 17886. La primera cepa fue la empleada para aislar el fago y demostrar la actividad lítica de la endolisina, y la segunda también había sido lisada por la misma previamente, aunque en un menor grado (Mayer y col. 2010). Se han descrito distintos espectros de actividad lítica para las endolisinas de los fagos de *Clostridium* spp. Las endolisinas Ply3626 y Psm codificadas por los bacteriófagos Φ 3626 y Φ SM101, respectivamente, de *C. perfringens* presentaron un espectro de actividad restringido a esta especie (Zimmer y col. 2002; Nariya y col. 2011). Sin embargo, la endolisina CP25L, además de mostrar actividad frente a todas las cepas de *C. perfringens* testadas, también fue activa frente a

Clostridium bifermentans, *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *B. subtilis* y *B. cereus* (Gervasi y col. 2014a). La endolisina CD27L, codificada por el bacteriófago Φ CD27 de *C. difficile*, mostró actividad lítica frente a las 30 cepas de *C. difficile* ensayadas, pero no frente a otras especies de *Clostridium* (Mayer y col. 2008). Sin embargo, la endolisina CS74L del fago ATCC 8074-B1 de *C. sporogenes* también presentó actividad lítica frente a *C. tyrobutyricum* y *C. acetobutylicum* (Mayer y col. 2012).

7. La endolisina CTP1L marcada con GFP permite determinar el amplio espectro de unión de la endolisina a las células vegetativas y esporas de *Clostridium* spp.

En vista del limitado espectro de actividad lítica de la endolisina CTP1L, nos planteamos su posible aplicación como método para detectar *Clostridium* spp. en queso (Objetivo 7). Para ello, tanto la endolisina entera (CTP1L) como sus dominios N-terminal (EAD, del inglés “enzymatically active domain”, dominio catalítico) y C-terminal (CBD, del inglés “cell wall binding domain”, dominio de unión), fueron expresados en *E. coli* como una fusión traslacional con GFP, siendo posteriormente purificadas. Se ensayaron las mismas cepas de *Clostridium* que se utilizaron para la actividad lítica.

El EAD no se unió a la pared celular de las cepas de *Clostridium* ensayadas. Sin embargo, la enzima completa y su CBD se unieron a 15 y 17 de las 20 cepas ensayadas, respectivamente. El menor tamaño del CBD podría explicar el mayor espectro de unión que mostró comparado con la endolisina, ya que esta característica favorecería el acceso a sus receptores en la pared celular bacteriana. Por otra parte, la unión de la endolisina no implicó necesariamente la lisis celular, ya que la endolisina solo presentó actividad lítica frente a dos cepas de *Clostridium*, mientras que se unió a 15 de ellas. En cambio, la unión sí resultó imprescindible para la actividad lítica (Mayer y col. 2010). Se han descrito distintos espectros de unión para las endolisinas fágicas, en ocasiones restringidos a una especie (Yang y col. 2012; Kong y Ryu 2016) e incluso solo a algunas cepas de la misma especie (Na y col. 2016), pero también algunas endolisinas han mostrado un espectro más amplio al unirse a diferentes especies del mismo género (Loessner y col. 2002; Schmelcher y col. 2010; Gu y col. 2011), como en nuestro estudio, e incluso pertenecientes a distintos géneros (Hu y col. 2010; Geroova y col. 2011).

Por otra parte, la endolisina CTP1L y su CBD fueron capaces de unirse a las esporas de *C. beijerinckii* INIA 77, que fue la única cepa de *Clostridium* de la que se pudo obtener una suspensión de esporas pura (sin restos de células vegetativas), siendo en esta Tesis Doctoral la primera vez que se describe la unión de una endolisina a las esporas de *Clostridium*. Este resultado fue inesperado, teniendo en cuenta las grandes diferencias que existen entre la composición de la pared celular de la célula vegetativa y las envueltas de la espora. Solo existe un trabajo previo en el que se describa la unión de una endolisina a esporas bacterianas, en el que la endolisina PlyG se unió a las células vegetativas y esporas de *B. anthracis*, pero a través de distintos dominios de unión (Yang y col. 2012). Sería interesante estudiar si la endolisina CTP1L utiliza distintos dominios para unirse a las células vegetativas y esporas de *Clostridium*, o si la pared celular de la célula vegetativa y alguna de las envueltas de la espora comparten algún epítipo que sea reconocido por el dominio de unión de la endolisina.

El ensayo de unión también fue realizado con bacterias lácticas pertenecientes a la microbiota del queso (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lb. reuteri*, *L. lactis* subesp. *lactis* y *cremoris*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc*, etc...) y no se observó unión en ningún caso.

8. El marcaje del dominio C-terminal de la endolisina CTP1L con GFP permite la detección de *C. tyrobutyricum* en queso

La detección temprana de *Clostridium* spp. puede constituir un primer paso en la prevención de la hinchazón tardía del queso si se adoptan las medidas adecuadas. La especificidad mostrada por la endolisina CTP1L y por su CBD, nos llevó a plantearnos su empleo como sistema de detección de *Clostridium* en queso (Objetivo 7). Elegimos llevar a cabo el estudio con el dominio de unión por presentar un mayor rendimiento de producción, una mayor estabilidad y un mayor espectro de unión que la endolisina.

Por tanto, esta técnica basada en el empleo del dominio C-terminal de la endolisina CTP1L marcado con GFP (GFP-CBD), fue aplicada en primer lugar, para la detección de *C. tyrobutyricum* en un queso hinchado de tamaño real de 8 meses de maduración, elaborado con leche intencionadamente contaminada con esporas de este microorganismo. La aplicación de esta técnica permitió visualizar por primera vez y de manera específica las células vegetativas de *Clostridium* en la matriz de un queso hinchado, ya que al aplicar la técnica sobre el queso

control (elaborado solo con fermentos, sin esporas) no se observaron células con fluorescencia, de acuerdo a los resultados obtenidos en medio líquido.

Posteriormente, la mejora del protocolo de detección, basada en una extracción previa de la microbiota del queso, permitió estudiar la evolución de *C. tyrobutyricum* durante 90 días de maduración en los quesos elaborados con un fermento mesófilo, esporas de este microorganismo, *Lb. reuteri* y glicerol (quesos correspondientes al apartado 4.2 de la presente discusión). El protocolo mejorado también nos permitió conocer el estado fisiológico de *Clostridium* mediante microscopía de contraste de fases y de fluorescencia, previa tinción del ADN bacteriano con 4', 6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). La unión específica de GFP-CBD a *C. tyrobutyricum* reveló la presencia de esporas germinadas en todos los quesos elaborados con las mismas a 1 día de maduración. A los 30 días, solo se detectaron células vegetativas de *C. tyrobutyricum* en los quesos elaborados con esporas y sin reuterina (elaborados con o sin *Lb. reuteri* y sin glicerol), que fueron los que presentaron hinchazón tardía. El número de células vegetativas de *Clostridium* aumentó con el tiempo de maduración en estos quesos, al igual que lo hicieron los síntomas de hinchazón. Sin embargo, en el queso elaborado con esporas, *Lb. reuteri* y glicerol (con producción de reuterina), no se detectó la presencia de células vegetativas de *Clostridium* a lo largo de la maduración, en consonancia con la ausencia de hinchazón en este queso.

La observación simultánea mediante microscopía de contraste de fases y fluorescencia con GFP-CBD y DAPI, reveló que las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* se lisan durante la maduración del queso, lo que podría explicar la dificultad encontrada por nuestro grupo de investigación durante años para aislar o contar células vegetativas de este microorganismo en quesos con hinchazón, a pesar de trabajar en anaerobiosis durante la manipulación de las muestras. Por otra parte, en ninguno de los quesos elaborados con esporas, ni siquiera en los que desarrollaron hinchazón, visualizamos esporas de *Clostridium*, confirmándose la baja tasa de esporulación de este microorganismo en queso de tamaño real, previamente observada mediante los recuentos en placa en la presente Tesis Doctoral. La baja tasa de esporulación de *C. tyrobutyricum* observada en nuestro trabajo podría explicar los bajos recuentos de esporas encontrados en quesos Manchego con hinchazón (Garde y col. 2011a; 2012a). El estado lisado de las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* en el queso junto con su baja tasa de esporulación en el mismo hacen difícil el aislamiento de este microorganismo.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes conclusiones:

1. *C. tyrobutyricum* resultó ser un potente agente causal de la hinchazón tardía del queso, si bien, otras especies de *Clostridium* también fueron capaces de producir hinchazón en el mismo, aunque en un grado mucho menor y en una etapa más avanzada de la maduración.
2. *C. tyrobutyricum* presentó un comportamiento diferente durante la elaboración y maduración de los quesos modelo y los de tamaño real. En los primeros, germinó y esporuló en distintos momentos de la maduración. Sin embargo, en los quesos de tamaño real, *C. tyrobutyricum* fue capaz de germinar tempranamente durante la etapa de prensado, y su tasa de esporulación fue baja o inexistente durante la maduración.
3. La nisina y la reuterina, antimicrobianos naturales producidos por bacterias lácticas, presentaron un amplio espectro anti-clostridium en RCM y en leche, ya que inhibieron el crecimiento de las células vegetativas y esporas de todas las cepas ensayadas.
4. La nisina producida *in situ* por *L. lactis* subesp. *lactis* INIA 415 no fue suficiente para prevenir la hinchazón tardía del queso causada por *C. tyrobutyricum*, ya que solo retrasó la aparición del defecto una semana.
5. La reuterina producida *in situ* por *Lb. reuteri* INIA P572 fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. tyrobutyricum* y prevenir la aparición de hinchazón del queso, sin perjudicar su calidad sensorial cuando el glicerol se añadió a la leche en concentraciones inferiores a 100 mM. Sin embargo, sería necesario realizar estudios adicionales sobre el metabolismo que la reuterina sufre en el queso y sobre su toxicidad y la de sus metabolitos antes de pensar en su posible aplicación industrial.
6. El estudio del efecto de las altas presiones sobre la germinación de las esporas de *C. tyrobutyricum* fue limitado, ya que este microorganismo germinó antes de la presurización. Probablemente debido a ello, la aplicación de un solo ciclo de alta presión a 300 MPa fue suficiente para inactivar las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* y prevenir la hinchazón tardía del queso sin afectar a su calidad sensorial.

7. La endolisina CTP1L, codificada por el bacteriófago virulento Φ CTP1 de *C. tyrobutyricum*, presentó un espectro de actividad lítica prácticamente restringido a la cepa huésped, no siendo capaz de lisar ninguna de las cepas de *Clostridium* aisladas de quesos con hinchazón. Sin embargo, su espectro de unión fue amplio, mostrando una especificidad a nivel de género y, además, la endolisina fue capaz de unirse a esporas de *Clostridium*.
8. El dominio de unión C-terminal de la endolisina CTP1L marcado con GFP reveló que las células vegetativas de *C. tyrobutyricum* se lisan durante la maduración del queso, y además confirmó la baja tasa de esporulación de este microorganismo. Este comportamiento de *C. tyrobutyricum* durante la maduración del queso explicaría la dificultad que existe para su aislamiento.

Conclusions

From the results obtained in this Doctoral Thesis, the following conclusions have been drawn:

1. *C. tyrobutyricum* proved to be a potent cheese spoiler causing late blowing defect, although other *Clostridium* species were also able to produce this defect in cheese, albeit to a certain extent and at a more advanced stage of ripening.
2. *C. tyrobutyricum* presented a different behaviour during the manufacture and ripening of model cheeses and industrial-scale cheeses. In the former, it germinated and sporulated at different ripening times. However, in the industrial-scale cheeses, *C. tyrobutyricum* showed an early spore germination, during the pressing stage, and its sporulation rate was low or non-existent during ripening.
3. Nisin and reuterin, natural antimicrobials produced by lactic acid bacteria, presented a broad anti-clostridia spectrum in RCM and in milk, as they inhibited the growth of vegetative cells and spores of all strains tested.
4. The nisin produced *in situ* by *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 was not enough to prevent the cheese late blowing caused by *C. tyrobutyricum*, since it only delayed the appearance of the defect by one week.
5. The reuterin produced *in situ* by *Lb. reuteri* INIA P572 was able to inhibit *C. tyrobutyricum* growth and to prevent the appearance of late blowing in cheese, without impairing its sensory quality, when glycerol was added to milk at concentrations below 100 mM. However, additional studies on the metabolism of reuterin in cheese, its toxicity and that of derivative metabolites, should be carried out before a feasible industrial application.
6. The study of the effect of high pressures on the germination of *C. tyrobutyricum* spores was limited, since this microorganism germinated prior to pressurization. Probably because of this, the application of a single high pressure cycle at 300 MPa was enough to inactivate vegetative cells of *C. tyrobutyricum* and to prevent late blowing defect of cheese without affecting its sensorial quality.

7. The endolysin CTP1L, encoded by the virulent bacteriophage Φ CTP1 of *C. tyrobutyricum*, showed a spectrum of lytic activity almost restricted to the host strain, being unable to lyse any of the *Clostridium* strains isolated from cheeses with late blowing defect. However, it showed a broad binding spectrum, with a genus-level of specificity, and in addition the endolysin was able to bind *Clostridium* spores.
8. The C-terminal binding domain of the GFP-labelled CTP1L endolysin revealed that the vegetative cells of *C. tyrobutyricum* lyse during cheese ripening, and further confirmed the low sporulation rate of this microorganism. This behaviour of *C. tyrobutyricum* during cheese ripening would explain the difficulties that exist for its isolation.

Bibliografia

- Abe F (2007) Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: Perspectives from piezophysiology. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71: 2347-2357.
- Amador-Noguez D, Brasg IA, Feng X-J, Roquet N, Rabinowitz JD (2011) Metabolome remodeling during the acidogenic-solventogenic transition in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7984-7997.
- Anastasiou R, Aktypis A, Georgalaki M, Papadelli M, De Vuyst L, Tsakalidou E (2009) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening. *International Dairy Journal* 19: 330-335.
- Angiolillo L, Conte A, Zambrini AV, Del Nobile MA (2014) Biopreservation of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science* 97: 5345-5355.
- Arias C, Oliete B, Seseña S, Jimenez L, Pérez-Guzmán M, Arias R (2013) Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of Manchega ewe milk: determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. *Small Ruminant Research* 111: 120-128.
- Arqués JL, Fernández J, Gaya P, Nuñez M, Rodríguez E, Medina M (2004) Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 95: 225-229.
- Arqués JL, Garde S, Gaya P, Fernández-García E, Nuñez M (2007) Volatile compounds, odor and aroma of La Serena cheese high pressure treated at two different stages of ripening. *Journal of Dairy Science* 90: 3627-3639.
- Arqués JL, Garde S, Gaya P, Medina M, Nuñez M (2006) Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high pressure treatments. *Journal of Dairy Science* 89: 888-891.
- Arqués JL, Rodríguez E, Nuñez M, Medina M (2008a) Antimicrobial activity of nisin, reuterin and lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cuajada, a semisolid dairy product manufactured in Spain. *Journal of Dairy Science* 91: 70-75.
- Arqués JL, Rodríguez E, Nuñez M, Medina M (2008b) Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology* 227: 77-82.
- Arqués JL, Rodríguez E, Nuñez M, Medina M (2011) Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control* 22: 457-461.
- Axelsson LTC, Chung WJ, Dobrogosz WJ, Lindgren SE (1989) Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2: 131-179.
- Bai J, Kim Y-T, Ryu S, Lee J-H (2016) Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in Microbiology* 7: 474.

- Balasubramaniam VM, Martínez-Monteagudo SI, Gupta R (2015) Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology* 6: 19.1-19.28.
- Barash JR, Hsia JK, Arnon SS (2010) Presence of soil-dwelling clostridia in commercial powdered infant formulas. *The Journal of Pediatrics* 156: 402-408.
- Bassi D, Cappa F, Cocconcelli PS (2009) A combination of a SEM technique and X ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. *Research in Microbiology* 160: 322-329.
- Bassi D, Fontana C, Zucchelli S, Gazzola S, Cocconcelli PS (2013) TaqMan real time quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal* 33: 75-82.
- Bassi D, Puglisi E, Cocconcelli PS (2015) Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology* 52: 106-118.
- Bennet SD, Walsh KA, Gould LH (2013) Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*-United States, 1998-2008. *Clinical Infectious Diseases* 57: 425-433.
- Bermúdez J, González MJ, Olivera JA, Burgueño JA, Juliano P, Fox EM, Reginensi SM (2016) Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheese making streams of 5 commercial dairy plants. *Journal of Dairy Science* 99: 3358-3366.
- Beshkova D, Frengova G (2012) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences* 12: 419-432.
- Betz JV, Anderson KE (1964) Isolation and characterization of bacteriophages active on *Clostridium sporogenes*. *Journal of Bacteriology* 87: 408-415.
- Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, Hoover DG (2007a) Response of spores to high-pressure processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 103-119.
- Black EP, Wei J, Atluri S, Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Hoover DG, Setlow P (2007b) Analysis of factors influencing the rate of germination of spores of *Bacillus subtilis* by very high pressure. *Journal of Applied Microbiology* 102: 65-76.
- Bogovic-Matijasic B, Rajsp MK, Perko B, Rogelj I (2007) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal* 17: 157-166.
- Brändle J, Doming KJ, Kneifer W (2016) Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control* 67: 96-113.
- Brändle J, Fraberger V, Schuller K, Zitz U, Kneifel W, Domig KJ (2017) A critical assessment of four MPN procedures for routine enumeration of cheese-damaging clostridia in milk. *International Dairy Journal* 73: 109-115.
- Brunt J, Cross KL, Peck MW (2015) Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. *Food Microbiology* 51: 45-50.

- Calzada J, del Olmo A, Picón A, Gaya P, Nuñez M (2013) Reducing biogenic-amine-producing bacteria, decarboxylase activity, and biogenic amines in raw milk cheese by high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 1277-1283.
- Capellas M, Mor-Mur M, Gervilla R, Yuste J, Guamis B (2000) Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiology* 17: 633-641.
- Casas IA, Dobrogosz WJ (2000) Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12: 247-285.
- Cato EP, George WL, Finegold SM (1986) Genus *Clostridium*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2. PHA Sneath, NS Mair, ME Sharpe, JG Holt (eds.). The Williams and Wilkins Company, pág. 1141-1200.
- Chang Y, Yoon H, Kang D-H, Chang P-S, Ryu S (2017) Endolysin Lys SA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in food. *International Journal of Food Microbiology* 244: 19-26.
- Charlebois A, Jacques M, Archambault M (2014) Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Frontiers in Microbiology* 5, 183.
- Chaturvedi A, Shukla S (2015) Occurrence of *Clostridium* species in different dairy products and its associated health risk. *International Journal of Recent Scientific Research* 6: 2827-2829.
- Chung TC, Axelsson LT, Lindgren SE, Dobrogosz WJ (1989) *In vitro* studies of reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2: 137-144.
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology* 7: 101.
- Clouston JG, Wills PA (1969) Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilis* spores by hydrostatic pressure. *Journal of Bacteriology* 97: 684-690.
- Cocolin L, Innocente N, Biasutti M, Comi G (2004) The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* 90: 83-91.
- Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13: 841-866.
- Consentino C, Paolino R, Valentini V, Musto M, Ricciardi A, Adduci F, D'adamo C, Pecora G, Freschi D (2015) Effect of jenny milk addition on the inhibition of late blowing in semihard cheese. *Journal of Dairy Science* 98: 5133-5142.
- Cremonesi P, Vanoni L, Silveti T, Morando S, Brasca M (2012) Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research* 79: 318-323.
- Curioni PMG, Bosset JO (2002) Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal* 12: 959-984.

- Dasgupta AP, Hull RR (1989) Late blowing of Swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 44: 82-87.
- Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J (1996) Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193-202.
- Doona CJ, Feeherry FE, Setlow B, Wang S, Li W, Nichols FC, Talukdar PK, Sarker MR, Li Y-Q, Shen A, Setlow P (2016) Effects of high pressure treatment on spores of *Clostridium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 5287-5297.
- Doyle CJ, Gleeson D, Jordan K, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD (2015) Anaerobic spore formers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 197: 77-87.
- Driehuis F, Hoolwerf J, Rademaker JLW (2016) Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. *International Dairy Journal* 63: 70-77.
- EFSA (2005) Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *EFSA Journal* 169: 1-65.
- EFSA (2009) Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from European Commission on the use and mode of action of bacteriophages in food production. *EFSA Journal* 1076: 1-26.
- EFSA (2010) Opinion of the scientific panel of food additives and nutrient sources added to food on the request from the European Commission related to scientific evidence for a revision of the maximum limits on nitrites in food adopted in Directive 2006/52/EC. Question number: EFSA-Q-2010-00097. Adopted on 11 March 2010. *EFSA Journal* 8: 1538.
- EFSA (2012) The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10: 2597.
- EFSA (2013) The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11: 3129.
- EFSA (2014) The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12: 3547.
- EFSA (2015a) The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13: 3991.
- EFSA (2015b) The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13: 4329.
- EFSA (2016) The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14: 4634.
- El-Ziney MG, Debevere JM (1998) The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. *Journal of Food Protection* 61: 1275-1280.
- Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A (2014) Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology* 5: 327-349.

- Engels C, Schwab C, Zhang J, Stevens MJA, Beri C, Ebert M-O, McNeill K, Sturla SJ, Lacroix C (2016) Acrolein contributes strongly antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific Reports* 6: 36246.
- Faccia M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile MA (2013) Influence of the milk, bactofugation and natural whey culture on the microbiological and physicochemical characteristics of Mozzarella cheese. *Journal of Food Processing and Technology* 4: 1-7.
- Feligini M, Brambati E, Panelli S, Ghitti M, Sacchi R, Capelli E, Bonacina C (2014) One-year investigation of *Clostridium* spp. occurrence in raw milk and curd of Grana Padano cheese by the automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Food Control* 42: 71-77.
- Fernández L, Álvarez S, Riera FA (2013) Microfiltration applied to dairy streams: removal of bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 187-196.
- Fernández-Cruz ML, Martín-Cabrejas I, Pérez-del Palacio J, Gaya P, Díaz-Navarro C, Navas JM, Medina M, Arqués JL (2016) *In vitro* toxicity of reuterin, a potential food biopreservative. *Food and Chemical Toxicology* 96: 155-159.
- Fischetti VA (2010) Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 357-362.
- Fox PE, Guinee TR, Cogan TM, McSweeney PLH (2000) *Fundamentals of Cheese Science*. PE Fox, TR Guinee, TM Cogan, PLH McSweeney (eds.). Aspen Publishers.
- Fremont S, Kanny G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA (1997) Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population. *Allergy* 52: 224-228.
- Fröhlich-Wyder M-T, Bachmann H-P (2007) Swiss cheese. En *Cheese problems solved*. PHL McSweeney (ed.). Woodhead Publishing Ltd., pág. 246-265.
- Furukawa S, Shimoda M, Hayakawa I (2003) Mechanism of the inactivation of bacterial spores by reciprocal pressurization treatment. *Journal of Applied Microbiology* 94: 836-841.
- Garde S, Arias R, Gaya P, Nuñez M (2011a) Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal* 21: 271-278.
- Garde S, Arqués JL, Gaya P, Medina M, Nuñez M (2007) Effect of high-pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *International Dairy Journal* 17: 1424-1433.
- Garde S, Ávila M, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2011b) Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150: 59-65.
- Garde S, Ávila M, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2012a) Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal* 25: 87-91.
- Garde S, Ávila M, Gómez N, Nuñez M (2013) *Clostridium* in late blowing defect of cheese: detection, prevalence, effects and control strategies. En *Cheese: Production, Chemistry and Sensory Properties*. H Castelli, L du Vale (eds.). Nova Science Publishers, pág. 503-518.

- Garde S, Gaya P, Arias R, Nuñez M (2012b) Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of *Clostridium* spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. *Food Control* 23: 392-399.
- Garde S, Gómez-Torres N, Ávila M (2017) Spore forming bacteria in dairy products. En *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities*. P. Poltronieri (ed.). John Wiley and Sons Ltd. Publishers, pág. 11-36.
- Gerova M, Halgasova N, Ugorcakova J, Bukovska G (2011) Endolysin of bacteriophage BFK20: evidence of a catalytic and a cell wall binding domain. *FEMS Microbiology Letters* 321: 83-91.
- Gervasi T, Horn N, Wegmann U, Dugo G, Narbad A, Mayer MJ (2014a) Expression and delivery of an endolysin to combat *Clostridium perfringens*. *Applied and Microbiology Biotechnology* 98: 2495-2505.
- Gervasi T, Lo Gurto R, Minniti E, Narbad A, Mayer MJ (2014b) Application of *Lactobacillus johnsonii* expressing phage endolysin for control of *Clostridium perfringens*. *Letters in Applied Microbiology* 59: 355-361.
- Giannoglou M, Karra Z, Platakou E, Katsaros G, Moatsou G, Taoukis P (2016) Effect of high pressure treatment applied on starter culture or on semi-ripened cheese in the quality and ripening of cheese in brine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 38: 312-320.
- González L, Zárate V (2015) Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture. *Journal of Dairy Research* 82: 236-241.
- Goudkov AV, Sharpe ME (1965) Clostridia in dairying. *Journal of Applied Bacteriology* 28: 63-73.
- Gould GW (2006) History of science-spores. *Journal of Applied Microbiology* 101: 507-513.
- Gould GW, Sale AJH (1970) Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology* 60: 335-346.
- Grove SF, Forsyth S, Wan J, Coventry J, Cole M, Stewart CM, Lewis T, Ross T, Lee A (2008) Inactivation of hepatitis A virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 206-210.
- Gu J, Lu R, Liu X, Han W, Lei L, Gao Y, Zhao H, Li Y, Diao Y (2011) LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci. *Current Microbiology* 63: 538-542.
- Gunasekaran S, Ak MM (2003) *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press.
- Guo T, Xin YP, Zhang C, Ouyang X, Kong J (2016) The potential of the endolysin Lysdb from *Lactobacillus delbrueckii* phage for combating *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture from raw milk. *Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins* 100: 3545-3554.
- Hayakawa I, Kanno T, Yoshiyama K, Fujio Y (1994) Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science* 59: 164-167.

- Hite BH (1899) The effect of pressure in the preservation of milk. *Bulletin West Virginia University Agricultural Experiment Station* 58: 15-35.
- Hou C, Zeng X, Yang F, Liu H, Qiao S (2015) Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6: 14.
- Hu S, Kong J, Kong W, Guo T, Ji M (2010) Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 2410-2418.
- Huang HW, Lung HM, Yang BB, Wang CY (2014) Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control* 40: 250-259.
- Huchet V, Thuault D, Bourgeois CM (1995) Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycerol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. *Lait* 75: 585-593.
- Ingham SC, Hassler JR, Tsai YW, Ingham BH (1998) Differentiation of lactate-fermenting, gas producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology* 43: 173-183.
- Johnson EA (2009) Bacteria: Clostridia. En *Encyclopedia of Microbiology*. M. Schaechter (ed.). Academic Press, pág. 87-93.
- Juan B, Barron LJR, Ferragut V, Guamis B, Trujillo AJ (2007a) Effects of high pressure treatment of volatile profile during ripening of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science* 90: 124-135.
- Juan B, Ferragut V, Buffa M, Guamis B, Trujillo AJ (2007b) Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science* 90: 2113-2125.
- Juan B, Trujillo AJ, Guamis V, Buffa M, Ferragut V (2007c) Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewes' milk cheese. *International Dairy Journal* 17: 248-254.
- Julien MC, Dion P, Lafreniere C, Antoun H, Drouin P (2008) Sources of clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6348-6357.
- Klijn N, Bovie C, Dommès J, Hoolwerf JD, Van der Waals CB, Weerkamp AH, Nieuwenhof, FFJ (1994) Identification of *Clostridium tyrobutyricum* and related species using sugar fermentation, organic acid formation and DNA probes based on specific 16S rRNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology* 17: 249-256.
- Klijn N, Nieuwenhof FFJ, Hoolwerf JD, Van Der Waals CB, Weerkamp AH (1995) Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2919-2924.
- Kong M, Ryu S (2016) Identification of a bacteria-specific binding protein from the sequenced bacterial genome. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 38-43.

- Kumar P, Sharma N, Ranjan R, Kumar S, Bhat ZF, Jeong DK (2013) Perspective of membrane technology in dairy industry: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 26: 1347-1358.
- Langa S, Landete JM, Martín-Cabrejas I, Rodríguez E, Arqués JL, Medina M (2013) *In situ* reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. *Food Control* 33: 200-206.
- Langa S, Martín-Cabrejas I, Montiel R, Peirotén A, Arqués JL, Medina M (2018) Protective effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in semi-hard cheese. *Food Control* 84: 284-289.
- Le Bourhis AG, Dore J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL (2007) Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology* 113: 154-163.
- Le Bourhis AG, Saunier K, Dore J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL (2005) Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 29-38.
- Ledenbach LH, Marshall RT (2010) Microbiological spoilage of dairy products. En *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. WH Sperber, MP Doyle (eds.). Springer Science and Business Media, pág. 41-67.
- Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, Setlow P, Maillard JY (2012) Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology* 113: 485-498.
- Lemieux L, Simard RE (1991) Bitter flavour in dairy-products. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait* 71: 599-636.
- Librán CM, Moro A, Zalacain A, Molina A, Carmona M, Berruga MI (2013) Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 1179-1188.
- Lindström M, Myllykoski J, Sivela S, Korkeala H (2010) *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50: 281-304.
- Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S (2002) C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology* 44: 335-349.
- López TJ, Roig AX, Capellas M, Trujillo AJ, Hernández M, Guamis B (2003) Evaluation of the importance of germinative cycles for destruction of spores of *Bacillus cereus* in miniature cheeses. *High Pressure Research* 23: 81-85.
- López-Pedemonte TJ, Roig-Sagués AX, Trujillo AJ, Capellas M, Guamis B (2003) Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science* 86: 3075-3081.
- Lüthi-Peng Q, Schärer S, Puhán Z (2002) Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 73-80.

- Malone AS, Wick C, Shellhammer TH, Courtney PD (2003) High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing. *Journal of Dairy Science* 86: 1139-1146.
- Martín-Cabrejas I, Langa S, Gaya P, Rodríguez E, Landete JM, Medina M, Arqués JL (2017) Optimization of reuterin production in cheese by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Food Science and Technology* 54: 1346-1349.
- Martínez-Cuesta MC, Bengoechea J, Bustos I, Rodríguez B, Requena T, Pelaez C (2010) Control of late blowing in cheese by adding lactacin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal* 20: 18-24.
- Martínez-Rodríguez Y, Acosta-Muñiz C, Olivas GI, Guerrero-Beltrán J, Rodrigo-Aliaga D, Mujica-Paz H, Welti-Chanes J, Sepulveda DR (2014) Effect of high hydrostatic pressure on mycelial development, spore viability and enzyme activity of *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology* 168: 42-46.
- Martínez-Rodríguez Y, Acosta-Muñiz C, Olivas GI, Guerrero-Beltrán J, Rodrigo-Aliaga D, Sepulveda DR (2012) High hydrostatic pressure processing of cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 399-416.
- Matteuzzi D, Trovatelli LD, Biavati B, Zani G (1977) Clostridia from Grana cheese. *Journal of Applied Microbiology* 43: 375-382.
- Mayenobe D, Didienne R, Pradel G (1983) Caractérisation des gonflements tardifs dans les fromages de St-Nectaire et certaines pâtes pressées. *Lait* 63: 15-24.
- Mayer MJ, Garefalaki V, Spoerl R, Narbad A, Meijers R (2011) Structure-based modification of a *Clostridium difficile*-targeting endolysin affects activity and host range. *Journal of Bacteriology* 193: 5477-5486.
- Mayer MJ, Gasson MJ, Narbad A (2012) Genomic sequence of bacteriophage ATCC 8074-B1 and activity of its endolysin and engineered variants against *Clostridium sporogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3685-3692.
- Mayer MJ, Narbad A, Gasson MJ (2008) Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin. *Journal of Bacteriology* 190: 6734-6740.
- Mayer MJ, Payne J, Gasson MJ, Narbad A (2010) Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5415-5422.
- McAuley CM, McMillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM (2014) Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *Journal of Dairy Science* 97: 7402-7412.
- McKenney PT, Driks A, Eichenberger P (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11: 33-44.
- McSweeney PLH (2004) Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57: 127-144.
- McSweeney PLH (2007) *Cheese problems solved*. PHL McSweeney (ed.). Woodhead Publishing Ltd.

- McSweeney PLH, Fox PF (2004) Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, vol. 1: General Aspects. PF Fox, PLH McSweeney, TM Cogan, TP Guinee (eds.). Elsevier Academic Press, pág. 361-371.
- Miller RW, Skinner EJ, Sulakvelidze A, Mathis GF, Hofacre CL (2010) Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with *Clostridium perfringens*. *Avian Diseases* 54: 33-40.
- Moerman F (2005) High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate food product. *Meat Science* 69: 225-232.
- Moir A, Cooper G (2015) Spore Germination. *Microbiology Spectrum* 3: TBS-0014-2012.
- Morales P, Fernandez-García E, Gaya P, Nuñez M (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal* 13: 201-209.
- Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatusu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuova H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Research* 15: 151-161.
- Moro A, Librán CM, Berruga MI, Carmona M, Zalacain A (2015) Dairy matrix effect on transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 1507-1513.
- Moschopoulou E, Anisa T, Katsaros G, Taoukis P, Moatsou G (2010) Application of high-pressure treatment on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 543-550.
- Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H (2002) Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32: 105-110.
- Mullan WMA (2000) Causes and control of early gas production in cheddar cheese. *International Journal of Dairy Technology* 53: 63-68.
- Na H, Kong M, Ryu S (2016) Characterization of LysPBC4, a novel *Bacillus cereus*-specific endolysin of bacteriophage PBC4. *FEMS Microbiology Letters* 363.
- Nariya H, Miyata S, Tamai E, Sekiya H, Maki J, Okabe A (2011) Identification and characterization of a putative endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1973-1979.
- Niewenhoff FFJ (1977) Mesophilic lactobacilli as a cause of nitrate reduction in Gouda cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 31: 153-162.
- Ortiz-Rivera Y, Sanchez-Vega R, Gutierrez-Mendez N, Leon-Felix J, Acosta-Muniz C, Sepulveda DR (2017) Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 100: 1-11.

- O'Sullivan DJ, Giblin L, McSweeney PLH, Sheehan JJ, Cotter PD (2013) Nucleic acid-based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects. *Frontiers in Microbiology* 4: 1-15.
- Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR (2011) Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology* 19: 85-94.
- Ratnay FP, Eppert I (2011) Secondary Cultures. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, pág. 567-573.
- Reindl A, Dzieciol M, Hein I, Wagner M, Zangerl P (2014) Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique. *Journal of Dairy Science* 97: 6036-6045.
- Rendueles E, Omer MK, Alvseike O, Alonso-Calleja C, Capita R, Prieto M (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Science and Technology* 44: 1251-1260.
- Rilla N, Martínez B, Delgado T, Rodríguez A (2003) Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology* 85: 23-33.
- Rivalain N, Roquain J, Demazeau, G (2010) Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances* 28: 659-672.
- Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Donovan DM, Martínez B, Rodríguez A, García P (2015) Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology* 36: 542-552.
- Ronk R (1988) Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Federal Register* 53: 11247-11251.
- Sable S, Cottenceau G (1999) Current knowledge of soft cheeses flavour and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4825-4836.
- Salmond GPC, Fineran PC (2015) A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology* 13: 777-786.
- Sarker MR, Akhtar S, Torres JA, Paredes-Sabja D (2015) High hydrostatic pressure induced inactivation of bacterial spores. *Critical Reviews in Microbiology* 41: 18-26.
- Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA (2010) The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* 156: 1589-1599.
- Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ (2012) Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future in Microbiology* 7: 1147-1171.
- Schmelcher M, Loessner MJ (2016) Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology* 37: 76-87.
- Schmelcher M, Shabarova T, Eugster MR, Eichenseher F, Tchang VS, Banz M, Loessner MJ (2010) Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent

- phage endolysin cell wall binding domains. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5745-5756.
- Scintu MF, Mannu L, Caria A (2004) Presence of spores of *Clostridium* spp in ewes' raw milk. *International Dairy Federation Special Issue. Congrès Future of the sheep and goats dairy sector. International Symposium. Zaragoza, España, pág. 187-188.*
- Setlow P (2014a) Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *Journal of Bacteriology* 196: 1297-1305.
- Setlow P (2014b) Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* 2: TBS-0003-2012.
- Singh TK, Drake MA, Cadwallader KR (2003) Flavor of cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2: 166-189.
- Somers EB, Taylor SL (1987) Antibotulinal effectiveness of nisin in pasteurized processed cheese spreads. *Journal of Food Protection* 50: 842-848.
- Sousa MJ, Ardö Y, McSweeney PLH (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International of Dairy Journal* 11: 327-345.
- Stevens M, Vollenweider S, Lacroix C (2011) The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. En *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. C. Lacroix (ed.). Woodhead Publishing Ltd., pág. 129-160.
- Stewart GC (2015) The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 437-457.
- Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ (1988) Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32: 1854-1858.
- Talarico TL, Dobrogosz WJ (1990) Purification and characterization of glycerol deshydratase from *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1195-1197.
- Tamime AY, Robinson RK, Kiers G (2006) Industrial Manufacture of Feta-Type Cheeses. En *Brined Cheeses*. A Tamime (ed.). Blackwell Publishing Ltd., pág. 77-116.
- Te Giffel MC, van der Horst HC (2004) Comparison between bactofugation and microfiltration regarding efficiency of somatic cell and bacteria removal. *Bulletin of the International Dairy Federation* 389: 49-53.
- Te Giffel MC, Wagendorp A, Herrewegh A, Driehuis F (2002) Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 625-630.
- Tracy BP, Jones SW, Fast AG, Indurthi DC, Papoutsakis ET (2012) Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 364-381.
- Turchi B, Pero S, Torracca B, Fratini F, Mancini S, Galiero A, Pedonese F, Nuvoloni R, Cerri D (2016) Occurrence of *Clostridium* spp. in ewe's milk: enumeration and identification of isolates. *Dairy Science and Technology* 96: 693-701.

- Van Tassell ML, Ibarra-Sánchez LA, Hoepker GP, Miller MJ (2017) Hot topic: antilisterial activity by endolysin PlyP100 in fresh cheese. *Journal of Dairy Science* 100: 2482-2487.
- Velasco R, Ordóñez JA, Cabeza MC, de la Hoz L, Cambero MI (2011) Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. *International Dairy Journal* 21: 493-500.
- Venugopal V, Nadkarni GB (1977) Regulation of arginine dihydrolase pathway in *Clostridium sporogenes*. *Journal of Bacteriology* 131: 693-695.
- Visser MMM, Driehuis F (2009) On-farm hygienic milk production. En *Milk processing and quality management*. AY Tamime (ed.). Wiley-Blackwell, pág. 1-22.
- Visser MMM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P, Lankveld JMG (2006) Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 89: 850-858.
- Visser MMM, Driehuis F, Te Giffel MC, De Jong P, Lankveld JMG (2007) Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. *Journal of Dairy Science* 90: 928-936.
- Vollenweider S, Evers E, Zurbriggen K, Lacroix C (2010) Unraveling the hydroxypropionaldehyde (HPA) system: an active antimicrobial agent against human pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10315-10322.
- Vollenweider S, Grassi G, König I, Puhani Z (2003) Purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3287-3293.
- Vollenweider S, Lacroix C (2004) 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 16-27.
- Wang C-Y, Huang H-W, Hsu C-P, Yang BB (2016) Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56: 527-540.
- Weizman Z, Asli G, Alsheikh (2005) Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* 115: 5-9.
- Xiao Y, Francke C, Abee T, Wells-Bennik MH (2011) Clostridial spore germination versus bacilli: genome mining and current insights. *Food Microbiology* 28: 266-274.
- Yamamoto K (2017) Food processing by high hydrostatic pressure. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 81: 672-679.
- Yang H, Wang DB, Dong Q, Zhang Z, Cui Z, Deng J, Yu J, Zhang XE, Wei H (2012) Existence of separate domains in lysin PlyG for recognizing *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 5031-5039.
- Yang ST, Zhu Y (2003) Anaerobic reactions. En *Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering*. DR Heldman (ed.). Marcel Dekker Inc., pág. 25-31.
- Zhao CJ, Schieber A, Gänzle MG (2016) Formation of taste-active amino acids, amino acid derivatives and peptides in food fermentations-A review. *Food Research International* 89: 39-47.

- Zimmer M, Vukov N, Scherer S, Loessner MJ (2002) The murein hydrolase of the bacteriophage phi3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5311-5317.
- Zuljan FA, Mortera P, Alarcón SH, Blancato VS, Espariz M, Magni C (2016) Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *International Dairy Journal* 62: 53-62.

